RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

DIMORFISMO SESSUALE NEI TROFOZOITI DEL GENERE *GIGADUCTUS (SPOROZOA, GREGARINIDA, GIGADUCTIDAE)*

ALESSANDRO FILIPPONI (*)

In un precedente studio statistico (FILIPPONI 1954) si è tentato di ricondurre il problema dell'esistenza di un dimorfismo sessuale nelle Gregarine su di un piano sperimentale, meno arbitrario e più rigoroso. Sebbene la presenza di un d. s. nelle Gregarine fosse stata recisamente negata da alcuni autori, è risultato, al contrario, che non solo è possibile rinvenire nelle Gregarine casi estremi di d. s. (d. s. *sensu stricto*), ma che, con ogni verisimiglianza, differenze sessuali morfologiche di un certo grado (d. s. *sensu proprio*) esistono sempre nei trofozoiti delle Gregarine.

Stando così le cose, ha senso proporsi un altro problema: come varia da specie a specie, nell'ambito di ciascuna famiglia di Gregarine, il grado globale del d. s. ed il comportamento dei singoli caratteri? Evidentemente, per rispondere al quesito, non esiste altra via che indagare sperimentalmente il comportamento di un congruo numero di specie, scelte a caso nelle diverse famiglie.

Con questa nota si vuol portare un primo contributo sperimentale al problema ora posto. I criteri per la scelta ed il trattamento del materiale e la metodologia statistica adottata sono già stati discussi e chiariti nel lavoro sopra citato al quale, per brevità, si rimanda.

MATERIALE E TECNICA

Lo studio sarà condotto su due specie del genere *Gigaductus*, *G. macrospora* Filipponi 1948 e *G. elongatus* (Moriggi 1943). Il genere comprende per ora, solo quattro specie ed è stato da me riferito (1948; 1951; 1953) ad una famiglia a se stante, *Gigaductidae*, contro il parere di altri autori (ELLIS 1913; WATSON 1916; MORIGGI 1943; GRASSÉ 1953). Invero la peregrina-

(*) *Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Parassitologia.*

zione di questo gruppo di specie da una attribuzione sistematica ad un'altra non sembra ancora finita. Recentemente REICHENOW (DOFLEIN e REICHENOW 1953) propone ancora un'altra soluzione: accettare il genere *Gigaductus*, inserendolo nella famiglia *Stenophoridae*. Nella mia risposta a GRASSÉ (1953) mi sono anche espresso contro una tale eventuale soluzione, allora non ancora avanzata, precisandone i motivi.

La scelta è caduta su queste due specie, in quanto solo per esse si possedevano dati statisticamente utilizzabili. Tuttavia, comprendendo l'intero gruppo solo quattro specie, la scelta a caso di due di esse può già darci una qualche indicazione circa il comportamento del d. s. in seno alle specie della famiglia *Gigaductidae*.

Le specie del genere *Gigaductus* compiono il loro sviluppo trofico attraverso tre stadi: entocitozoico, enterozoico solitario, enterozoico biassociato. La biassociazione è del tipo pro-ipodesmico, con primiti e satelliti, e quindi l'identificazione dei due sessi non presenta difficoltà di sorta (FILIPPONI 1954).

Per *G. macrospora* si disponeva (FILIPPONI 1948) di un campione di 106 trofozoiti biassociati (53 primiti e 53 satelliti), rinvenuti nell'intestino di numerosi esemplari di *Laemostenus algerinus* provenienti da differenti località della periferia di Roma. Per *G. elongatus* si disponeva (FILIPPONI 1951) di un campione di 92 trofozoiti biassociati (46 primiti e 46 satelliti) tutti ottenuti dalla dissezione di soli 5 esemplari di *Calathus fuscipes* var. *latus*; catturati in località Caffarella (Roma).

La tecnica seguita per la misurazione dei trofozoiti fu identica nei due casi: dissezione degli intestini degli ospiti in soluzione fisiologica; fissazione dei parassiti in formolo picrico; misurazioni eseguite, il giorno successivo, al microscopio, con oculare micrometrico; approssimazione nelle misure a meno di 2 micron.

Allo scopo di operare su individui piuttosto prossimi alla maturità sessuale (FILIPPONI 1954), primiti e satelliti delle due specie furono disposti in ordine di lunghezza totale crescente e da ciascuna delle quattro serie furono prelevati gli ultimi trenta che formano oggetto della presente indagine.

Per ogni trofozoite sono stati presi in considerazione undici caratteri, cinque dimensioni lineari e sei differenti raffronti tra esse effettuabili. Le dimensioni lineari, tutte espresse in micron, sono: lunghezza totale (*LT*), lunghezza del protomerite (*LP*), lunghezza del deutomerite (*LD*), larghezza massima del protomerite (*WP*), larghezza massima del deutomerite (*WD*). I raffronti calcolati sono: due raffronti quantitativi, *LP.WP* e *LD.WD*, assunti come valutazione, sia pur grossolana, delle aree delle sezioni ottiche del protomerite e del deutomerite; due raffronti tipicamente morfologici, l'indice protomeritico, *LP/WP*, e l'indice deutomeritico, *LD/WD*, che traducono in espressione quantitativa la forma più o meno allungata delle due por-

zioni del trofozoite; infine i rapporti, *LD/LP* e *WD/WP*, che rappresentano il diverso sviluppo in lunghezza e larghezza del protomerite e del deutomerite.

Analisi biometrica

Le tabelle 1 e 3 riportano, per le due specie, e per ciascuno degli undici caratteri analizzati i valori delle medie aritmetiche nei primiti (M_p) e nei satelliti (M_s); i valori delle differenze tra le medie (D_M); i valori di t per i rispettivi gradi di libertà, indicati in parentesi quadra; infine i valori della probabilità (P) che le differenze siano dovute a cause accidentali.

Con questo primo tipo di analisi si è voluto determinare la rappresentatività dei campioni, o, in altri termini, si è cercato di stabilire con quale probabilità di essere nel giusto è lecito attribuire alle specie alle quali i campioni esaminati appartengono l'esistenza di differenze sessuali.

Le tabelle 2 e 4 danno i valori della intensità di transvariazione (I_{ps}) tra le distribuzioni di ciascun carattere nei primiti e nei satelliti ed i valori del rapporto (R_{M}) tra media minore e media maggiore. Mediante i valori di I_{ps} si è misurata la *tipicità* delle differenze tra le medie di ciascun carattere nei primiti e nei satelliti; mediante i valori di R_M si è misurata l'*intensità* delle stesse differenze.

A valori nulli di I_{ps} corrisponde una tipicità massima; a valori di I_{ps} eguali a uno una tipicità nulla. Graduando gli undici caratteri secondo i valori crescenti di I_{ps}, essi verranno graduati secondo la tipicità decrescente delle loro differenze sessuali. A valori di R_M eguali a uno corrisponde una intensità nulla; l'intensità tra le differenze sessuali sarà tanto maggiore per quanto il valore di R_M sarà più vicino a zero. Graduando gli undici caratteri secondo i valori crescenti di R_M, essi verranno graduati secondo l'intensità decrescente delle loro differenze sessuali.

Intendendo per « sessualità » di un carattere l'attitudine del carattere a differenziare i sessi, essa dipenderà sia dalla tipicità che dalla intensità delle differenze sessuali (Filipponi 1954). Nelle tabelle 2 e 4 i singoli caratteri sono stati graduati tenendo conto, come criterio principale, della tipicità delle differenze sessuali e, come criterio ausiliario, della intensità delle stesse differenze, per i caratteri a tipicità eguale. Le tabelle 2 e 4 ci danno quindi, per ciascuna specie, *la scala degli undici caratteri secondo la loro sessualità decrescente*. I risultati ottenuti ovviamente sono validi solo nell'ambito delle serie empiriche che li hanno forniti.

Per agevolare l'esame del senso delle differenze, nella tabella 5 sono riportati, uno accanto all'altro, per ciascuna delle due specie, i valori del rapporto tra la media dei primiti (M_p) e la media dei satelliti (M_s). Se il valore del rapporto è maggiore di uno, le medie dei primiti superano quelle dei satelliti, sono invece ad esse inferiori se il rapporto è inferiore all'unità.

TABELLA 1

Valori medi per 11 caratteri in 30 primiti (M_p) *e 30 satelliti* (M_s) *di* Gigaductus macrospora *e significatività delle loro differenze* (D_M) *determinata mediante il* t *« Student ».*

Carattere	M_p	M_s	D_M	$t_{[58]}$	P
LT	107,03	115,90	8,87	2,652	0,02 - 0,01
LP	21,23	20,70	0,53	0,844	0,5 - 0,4
LD	86,00	95,23	9,23	2,778	< 0,01
WP	31,63	38,17	6,54	5,781	< 0,01
WD	56,93	50,07	6,86	3,060	< 0,01
LP . WP	674	796	122	3,035	< 0,01
LD . WD	4948	4857	91	0,275	> 0,5
LP / WP	0,668	0,543	0,125	7,343	< 0,01
LD / WD	1,511	1,923	0,412	8,116	< 0,01
LD / LP	4,152	4,713	0,581	3,782	< 0,01
WD / WP	1,827	1,316	0,511	12,295	< 0,01

TABELLA 2

Valori dell'intensità di transvariazione (I_{ps}) *e del rapporto tra media minore e media maggiore* (R_M) *per gli stessi caratteri della tabella 1. I caratteri sono graduati secondo la tipicità decrescente delle loro differenze sessuali.*

N° d'ordine	Carattere	I_{ps}	R_M
1	LD / WD	0,00320	0,786
2	WD / WP	0,00396	0,720
3	LP / WP	0,10558	0,813
4	WP	0,19262	0,827
5	LD / LP	0,22883	0,877
6	WD	0,41145	0,880
7	LP . WP	0,45086	0,847
8	LD	0,48271	0,903
9	LT	0,53873	0,923
10	LP	0,77277	0,975
11	LD . WD	0,93762	0,982

TABELLA 3

Valori medi per 11 caratteri in 30 primiti (M_p) *e 30 satelliti* (M_s) *di* Gigaductus elogantus *e significatività delle loro differenze* (D_M) *determinate mediante il* t *di di « Student ».*

Carattere	M_p	M_s	D_M	$t_{[58]}$	P
LT	95,98	94,51	1,47	1,122	0,3 - 0,2
LP	18,65	19,05	0,40	1,044	0.3 - 0,2
LD	77,32	75,46	1,86	1,445	0,2 - 0,1
WP	33,02	45,38	12,86	22,248	< 0,01
WD	61,99	59,33	2,66	2,250	0,05 - 0,02
LP . WP	616,63	864,77	248,14	12,556	< 0,01
LD . WD	4809,77	4488,50	321,27	2,124	0,05 - 0,02
LP / WP	0,565	0,420	0,145	12,311	< 0,01
LD / WD	1,246	1,270	0,024	1,219	0,3 - 0,2
LD / LP	4,166	3,986	0,180	1,557	0,2 - 0,1
WD/WP	1,871	1,304	0,567	23,980	< 0,01

TABELLA 4

Valori dell'intensità di transvariazione (I_{ps}) *e del rapporto tra media minore e media maggiore* (R_M) *per gli stessi caratteri della tabella 3. I caratteri sono graduati secondo la tipicità decrescente delle loro differenze sessuali, e secondo l'intensità decrescente delle stesse differenze, se la tipicità è identica.*

N° d'ordine	Carattere	I_{ps}	R_M
1	WD / WP	0,00000	0,697
2	WP	0,00000	0,728
3	LP / WP	0,00000	0,743
4	LP . WP	0,00748	0,713
5	WD	0,56362	0,957
6	LD . WD	0,60507	0,933
7	LD / LP	0,66417	0,957
8	LD	0,70749	0,976
9	LP	0,75612	0,979
10	LT	0,77009	0,985
11	LD / WD	0,80509	0,981

TABELLA 5

Valori del rapporto M_p / M_s in G. macrospora e G. elongatus per dimostrare il senso delle differenze. Se il valore del rapporto è maggiore di uno, le medie dei primiti superano quelle dei satelliti, sono invece ad esse inferiori se il rapporto è inferiore all'unità.

N° d'ordine	Caratte e	*G. macrospora*	*G. elongatus*
1	LT	0,923	1,016
2	LP	1,026	0,979
3	LD	0,903	1,025
4	WP	0,827	0,728
5	WD	1,137	1,045
6	LP . WP	0,847	0,713
7	LD . WD	1,019	1,072
8	LP / WP	1,230	1,345
9	LD / WD	0,786	0,981
10	LD / LP	0,877	1,045
11	WD / WP	1,388	1,435

Infine, allo scopo di permettere una comparazione del *grado globale del dimorfismo sessuale* tra una specie e l'altra, ci si è serviti della media degli undici valori di I_{ps}, come misura della *tipicità* media delle differenze sessuali, e della media degli undici valori di R_M, come misura dell'*intensità* media delle stesse differenze. Con questi valori medi si è costruita una scala bidimensionale (grafico della fig. 3) del grado globale del dimorfismo, includendo anche i valori relativi ad altre tre specie studiate nel precedente lavoro (FILIPPONI 1954), *Gregarina dimorpha, Protomagalhaensia marottai, Gregarina larvarum.*

In ascisse sono i valori medi di R, in ordinate i valori medi di I_{ps}. I valori di R_M si succedono in ordine decrescente da sinistra a destra, e quindi l'intensità delle differenze sessuali aumenta da sinistra a destra. I valori di I_{ps} si succedono in ordine decrescente dal basso in alto, e quindi la tipicità delle differenze sessuali aumenta dal basso in alto. In una specie sessualmente isomorfa, in tutti i suoi caratteri, si otterrebbe un valore medio di I_{ps} eguale all'unità, o, tenuto conto degli scarti accidentali, piuttosto prossimo all'unità; altrettanto avverrebbe per il valore medio di R_M. Una specie isomorfa verrebbe quindi a stabilirsi, nella scala bidimensionale, verso l'angolo in basso a sinistra. La posizione di una specie qual-

siasi verrà a trovarsi tanto più in alto per quanto maggiore è la tipicità media delle differenze sessuali, e tanto più a destra per quanto maggiore è l'intensità media delle differenze sessuali.

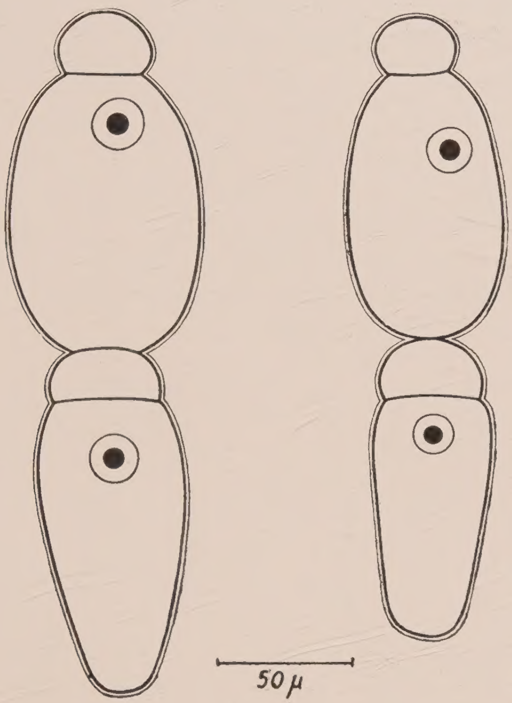


FIG. 1 - Due biassociazioni di G. *macrospora*, fissate in formolo picrico e disegnate alla camera lucida.

E' ovvio che gli undici caratteri analizzati, sebbene comprendano tutti i caratteri misurabili, utilizzati di solito nelle diagnosi delle Gregarine, sono ben lungi dal rappresentare la totalità dei caratteri morfologici individuabili in una gregarina. L'espressione « grado globale del dimorfismo sessuale » va quindi intesa limitatamente agli undici caratteri esaminati. Tuttavia, poichè il criterio che ci ha guidati nella scelta del gruppo, necessariamente ristretto, dei caratteri da analizzare, e cioè il fatto di prestarsi ad una precisa classificazione, non ha nesso alcuno con il fenomeno che si indaga, ossia il d. s., la scelta deve ritenersi casuale, per questo riguardo, ed il confronto tra specie e specie, effettuato sempre in base al comportamento dello stesso gruppo di caratteri, non perde nulla del suo valore comparativo.

Discussione dei risultati

In *G. macrospora* (tabella 1) per 9 caratteri i valori medi nei primiti e nei satelliti risultano statisticamente diversi; in *G. elongatus* (tabella 3) le differenze possono ritenersi significative per 6 caratteri. In ciascuna delle due specie, quindi dobbiamo ammettere l'esistenza di differenze sessuali.

Sia in *G. macrospora* (tabella 2) che in *G. elongatus* (tabella 4) appaiono differenze sessuali con elevata tipicità, come per il 1° e 2° carattere di *G. macrospora* e per il 1°, 2°, 3° e 4° di *G. elongatus*. Anzi i primi tre caratteri di quest'ultima specie hanno valori di I_{ps} nulli, ossia con una tipicità delle differenze sessuali massima, come abbiamo visto verificarsi (Filipponi 1954) solo in *G. dimorpha*. Inoltre, in entrambe le specie, il valore medio di I_{ps} è più vicino a zero che ad uno. Il preteso isomorfismo delle Gregarine (Watson 1916; 1918; Bullough 1951), appare dunque, ancora una volta, contradetto dai fatti.

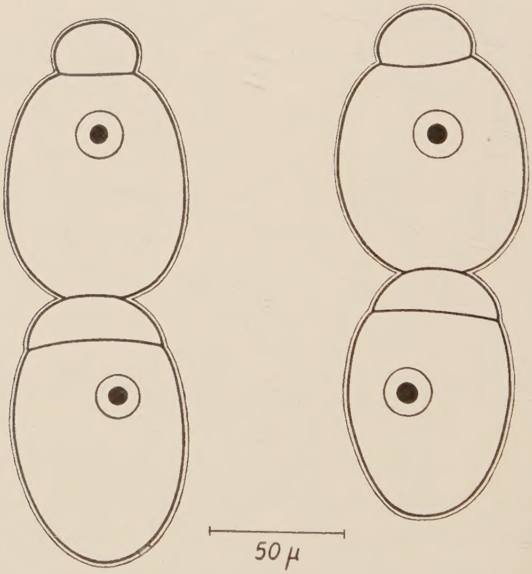


Fig. 2 - Due biassociazioni di *G. elongatus*, fissate in formolo picrico e disegnate alla camera lucida.

La posizione delle due specie in esame nella scala bidimensionale del dimorfismo globale (fig. 3) è circa a metà strada tra i due casi estremi fin'ora segnalati, e cioè *G. dimorpha* e *G. larvarum*. Il primato nella graduatoria del d. s. nelle Gregarine, resta ancora, per il momento, a *G. dimorpha;* ma anche il grado del d. s. nei due *Gigaductus* è da ritenersi piuttosto elevato.

Sebbene il grado globale del d. s. sia stato calcolato per sole cinque specie, la posizione di ciascuna di esse appare largamente scaglionata nella

scala bidimensionale della fig. 3. Estendendo l'esame ad un numero cospicuo di specie, è facile prevedere la possibilità di ottenere tutta una gamma continua, sia nella graduazione della tipicità, che della intensità delle differenze sessuali. Questo significa che la distinzione tra un d. s. *sensu stricto* e un d. s. *sensu proprio*, anche se opportuna, è puramente convenzionale. Ciò che esiste nella realtà è una gamma continua nel grado del d. s. delle varie specie gonocoriche.

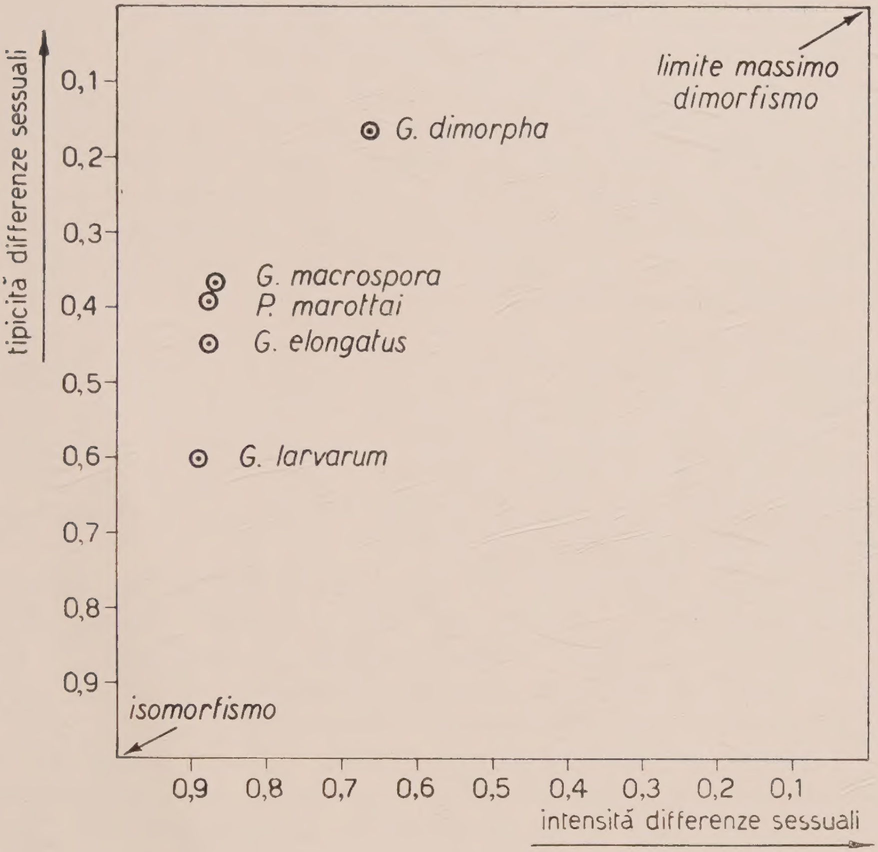


FIG. 3 - Scala bidimensionale del grado globale del dimorfismo sessuale, relativo ad 11 caratteri, in 5 specie di gregarine: *Gregarina dimorpha*, *Gregarina larvarum*, *Protomagalhaensia marottai*, *Gigaductus macrospora*, *Gigaductus elongatus*.

La scala tiene conto sia della *intensità* che della *tipicità* delle differenze sessuali. L'intensità è misurata, per ogni carattere, dal rapporto (R_{M}) tra media minore e media maggiore; la tipicità dalla intensità di transvariazione (I_{ps}) tra la distribuzione dell'intensità di ciascun carattere nei due sessi. L'intensità delle differenze è tanto più grande per quanto il valore di R_{M} si avvicina di più a zero; la tipicità è tanto più grande per quanto il valore di I_{s} si avvicina di più a zero.

Nel grafico, per ogni specie, si riporta in ascisse il valore medio degli 11 valori di R_{M}; in ordinate il valore medio degli 11 valori di I_{s}. Una specie potrà considerarsi tanto più sessualmente dimorfa per quanto la sua posizione, nella scala, è situata più in alto e più a destra.

E veniamo ad esaminare il comportamento dei singoli caratteri nelle due specie oggetto del presente studio. Sebbene, come è stato osservato, in *G. elongatus*, ci siano tre caratteri con valori nulli di I_{ps}, il dimorfismo globale di questa specie risulta inferiore a quello di *G. macrospora*. Evidentemente, nelle due specie, il grado di sessualità, nel senso precedentemente precisato, è diversamente distribuito tra i vari caratteri. In *G. elongatus* il dimorfismo risulta maggiormente concentrato su un minor numero di caratteri. Ed eccone una conferma. Nella scala del grado della sessualità dei caratteri in *G. macrospora* bisogna arrivare al 9° posto per trovare un valore di I_{ps} pari a 0,5387; in *G. elongatus* questo valore è già superato dal 5° carattere della scala. Questa prima differenza nel comportamento della sessualità dei caratteri tra le due specie ha una conseguenza pratica, degna di rilievo. Distaccati primiti e satelliti di ogni coppia, nell'ambito di ciascuna specie, e mescolatili tra loro, in entrambi i casi sarebbe possibile riconoscere con sicurezza primiti e satelliti; peraltro, la diagnosi dei sessi sarebbe assai più agevole in *G. elongatus*, non ostante che il suo dimorfismo globale risulti minore che nell'altra specie.

Le differenze tra le due specie non si esauriscono in una diversa concentrazione della sessualità tra caratteri corrispondenti. Nella graduatoria dei caratteri secondo la rispettiva sessualità decrescente (tabelle 2 e 4) . singoli caratteri non si succedono, nelle due specie, nello stesso ordine. E non basta. Dal confronto dei rapporti tra i valori medi nei primiti e nei satelliti (tabella 5) risulta che non in tutti i casi i valori medi differiscono, nelle due specie, nello stesso senso.

Come esempio del primo fatto si segnala il caso più tipico, rappresentato dall'indice deutomeritico, *LD/WD*, che in *G. macrospora* compare all'apice della scala e in *G. elongatus* si trova addirittura all'ultimo posto. Il valore di I_{ps} è 0,00320 nel primo caso; è 0,80509 nel secondo: un contrasto nettissimo, dunque, estendibile sicuramente dai campioni alle specie.

L'inversione nel senso tra le differenze tra medie si verifica per ben quattro caratteri. In particolare, mentre in *G. macrospora* la lughezza totale *LT*, dei satelliti supera quella dei primiti, in *G. elongatus* si manifesta la tendenza opposta. Una situazione analoga si ripete sia per la lunghezza del deutomerite, *LD*, che per il valore del rapporto *LD/LP*. Infine per la lunghezza del protomerite, *LP*, in *G. macrospora* i primiti tendono a superare i satelliti, in *G. elongatus* avviene esattamente l'opposto.

Torniamo al caso dell'indice deutomeritico. Traducendo l'ermetismo delle cifre in linguaggio più accessibile, potremmo dire che, mentre in *G. macrospora* il satellite (M_s = 1,923) è nettamente più allungato del primite (M_p = 1,511), in *G. elongatus* non solo primiti e satelliti sono complessivamente più tozzi (M_p = 1,246; M_s = 1,270) che nella specie precedente, ma la tendenza, nei satelliti ad un maggior allungamento è, in questo caso

lievissima. Verrebbe comunque fatto di domandarsi se la tendenza, nei satelliti, ad un maggior allungamento non fosse connessa, per caso, ad una qualche esigenza funzionale propria ad uno dei sessi. Ma quando si constata, non ostante la stretta affinità sistematica delle due specie, una così forte differenza nell'intensità del fenomeno, e si ricorda che in altre specie, *G. dimorpha* ad esempio, è il primite ad essere più allungato, ci si convince che la risposta non è semplice. Altrettanto problematico sarebbe volersi render conto del perchè, nei quattro caratteri sopra ricordati, il senso della divergenza si inverta. L'unica constatazione che se ne può trarre è che il diverso comportamento nella sessualità dei caratteri è una caratteristica propria di ciascuna specie.

Non per tutti i caratteri, tuttavia, le divergenze sono egualmente accentuate. Un esempio ci è offerto dall'indice protomeritico, LP/WP, e dal rapporto tra le due larghezze, WD/WP, con un comportamento piuttosto convergente nelle due specie. In entrambi i casi, infatti, i due caratteri si ritrovano nei tre primi gradini della scala ed i loro valori di I_{ps} seppure diversi, non lo sono in grado eccessivo. La loro analisi ci interessa per altro verso.

Nelle Gregarine ad associazione pro-ipodesmica il satellite, che corrisponde al gamonte maschile, si aggancia al primite, che è il gamonte femminile. Nelle specie del genere *Gigaductus*, all'estremità anteriore del satellite non si differenziano formazioni particolari per l'agganciamento, come avviene in altri casi (FILIPPONI 1954). Solo l'estremità posteriore del primite subisce un leggero infossamento in cui alloggia l'apice arrotondato del satellite. E' stato supposto che le eventuali differenze rilevabili tra primiti e satelliti, possano essere dovute al semplice fatto della compressione subita dal protomerite del satellite nell'agganciamento. Ho sostenuto altrove (1954) che una tale ipotesi semplicistica non può spiegare tutta la congerie di differenze sessuali presenti nei trofozoiti delle Gregarine e risultanti a carico di qualunque tipo di caratteri. Il comportamento dei caratteri, fin'ora considerati, in queste due specie, ne dà del resto la piena conferma. Il dubbio può però tornare proprio a proposito dei due ultimi caratteri accennati, in ciascuno dei quali compare almeno una dimensione del protomerite del satellite.

Ma anche in questo caso la compressione non c'entra; ed è facile convincersene. E' vero infatti che in tutte e due le specie il protomerite nel satellite è più schiacciato che nel primite; ma se la causa determinante fosse l'agganciamento, trovandosi i satelliti delle due specie nelle precise identiche condizioni, non si capirebbe perchè lo schiacciamento in *G. elongatus* (M_g = 0,420) dovrebbe risultare assai più pronunciato che in *G. macrospora* (M_g = 0,543). Inoltre, osservando i disegni riprodotti nelle figg. 1 e 2, si constata agevolmente come le differenze tra primiti e satelliti interessino

anche i setti proto-deutomeritici, che non si vede come possano essere influenzati dall'agganciamento. Anzi, se avessimo prese le misure dei setti, avremmo potuto mettere in evidenza un altro carattere fortemente sessuale, in ognuna delle due specie, sebbene con grado diverso.

Tra le differenze sessuali, note nei metazoi, appaiono a volte accentuate quelle relative alla mole raggiunta dai due sessi, anche se, pure in questo caso, le differenze non sono sempre a vantaggio dello stesso sesso. Come si comportano al riguardo le due specie esaminate? Ci serviremo a questo scopo dei due raffronti quantitativi, *LP.WP* e *LD.WD*, che rappresentano geometricamente l'area di due rettangoli, aventi per lati la lunghezza e la larghezza massima rispettivamente del protomerite e del deutomerite. Queste aree non si identificano evidentemente con la mole che è un volume, e sono esse stesse già grossolane approssimazioni, per eccesso, delle aree dei profili delle due porzioni del trofozoite; ma, tra i caratteri analizzati, sono ancora quelli più idonei a darci un'idea del fenomeno che si vuole indagare.

Sebbene in grado diverso, sia in *G. macrospora* che in *G. elongatus* i valori medi di *LD.WD* sono più elevati nei primiti che nei satelliti; i valori medi di *LP.WP*, al contrario, sono maggiori nei satelliti. Le due differenze tendono, quindi, a compensarsi. Per avere una qualche valutazione della risultante di queste due differenti tendenze, potremo calcolare la somma dei valori medi delle due aree. Ed ecco i risultati. In *G. macrospora* il totale delle due aree, espresso in micron quadrati, è: nei primiti 5622, nei satelliti 5653; in *G. elongatus*: nei primiti 5427, nei satelliti 5354. Ossia, limitatamente ai due campioni esaminati, in *G. macrospora* la mole dei satelliti supera quella dei primiti; ed è invece superata da questa in *G. elongatus* In quest'ultima specie, la differenza tra le aree totali nei primiti e nei satelliti è molto lieve; va però tenuto conto che, mentre la superiorità delle aree deutomeritiche dei primiti non è statisticamente significativa, lo è invece la superiorità delle aree protomeritiche dei satelliti. E' quindi piuttosto attendibile che il giudizio ora espresso possa essere esteso dai campioni alle specie. Avremo, cioè, tra le due specie, un quinto caso di inversione nel senso delle differenze sessuali.

Conclusioni

Differenze sessuali secondarie morfologiche risultano ora provate anche a carico di trofozoiti di *Gigaductidae*. Anzi, com'era avvenuto in *Gregarina dimorpha*, abbiamo ritrovato in una specie di questa famiglia, *G. elongatus*, caratteri con valori nulli di I_{ps}, e cioè con tipicità massima delle differenze sessuali. Per ciascuna delle due specie esaminate, distaccando primiti e satelliti da coppie, prossime alla maturità sessuale, e mescolandoli tra loro,

sarebbe possibile ripararli di nuovo, con estrema sicurezza, in base alle differenze sessuali.

Il grado globale del d. s., nelle due specie, è circa intermedio tra i casi estremi precedentemente segnalati, vale a dire *Gregarina dimorpha* e *Gregarina larvarum*. In *G. macrospora* esso è più elevato che in *G. elongatus*, ma in ciascuna delle due specie può ritenersi notevole.

Divergenze più accentuate tra le due specie appaiono in rapporto al comportamento della sessualità dei singoli caratteri. Non ostante la loro stretta affinità sistematica, da una specie all'altra cambia il grado di sessualità di ciascun carattere, cambia l'ordine di successione dei vari caratteri nella graduatoria della rispettiva sessualità decrescente, cambia perfino in alcuni caratteri il senso della divergenza. E' onesto riconoscere che la sensibilità dell'analisi quantitativa ci mette in evidenza più fatti di quanti non ne sappiamo spiegare. D'altro canto, poichè è da escludere che il diverso comportamento dei singoli caratteri nelle due specie possa essere determinato da fattori estrinsechi, non resta che riferirlo, in genere, a fattori intrinsechi. Dobbiamo cioè limitarci, per il momento, a constatare che le diverse manifestazioni della sessualità dei caratteri sono peculiari della costituzione genetica di ciascuna specie.

Volendo conoscere il grado globale del d. s. ed il comportamento dei singoli caratteri nelle specie della famiglia *Gigaductidae*, siamo stati costretti, per mancanza di dati, a saggiare una campionatura di sole due specie. I risultati ottenuti sconsigliano di azzardare previsioni circa il comportamento delle altre due specie non esaminate. Si è comunque dimostrato che, nella famiglia *Gigaductidae*, esistono almeno due specie con differenze sessuali accentuate. Questo induce a ritenere che il d. s., inteso in senso stretto, debba essere assai più diffuso, nelle Gregarine, di quanto non lo lasciassero supporre gli autori che pretendevano escludere, in questo gruppo di Sporozoi, differenze sessuali morfologiche di qualunque grado.

RIASSUNTO

Sono state analizzate le differenze sessuali relative ad 11 caratteri in due specie del genere *Gigaductus*, *G. macrospora* e *G. elongatus*.

Sia in *G. macrospora* che in *G. elongatus* il d. s. risulta accentuato. In entrambi i casi, separati primiti e satelliti in biassociazioni mature, sarebbe possibile riconoscerli con certezza. Ciò dimostra che un d. s. *sensu stricto* è assai più diffuso, nelle gregarine, di quanto comunemente si ritenesse.

Il confronto delle differenze sessuali tra le due specie ha inoltre messo in evidenza che, non ostante la loro stretta affinità sistematica, non esiste, tra le due specie, un parallelismo di comportamento nei singoli caratteri. L'intensità e la tipicità delle differenze sessuali, relative allo stesso carattere, sono, in genere, differenti nelle due specie; e, per alcuni caratteri, da una specie all'altra cambia perfino il senso delle divergenze. Se ne deduce che le diverse manifestazioni del d. s. nei caratteri esaminati sono peculiari della costituzione genetica di ciascuna specie ed

hanno seguito in ognuna di esse una propria evoluzione indipendente: di conseguenza dall'esame di qualche specie non è possibile predire il comportamento del d. s. in specie affini, sia pure nell'ambito dello stesso genere.

SUMMARY

Eleven characters of the two species of gregarines, *Gigaductus macrospora* and *Gigaductus elongatus* have been analised for sexual differences. Samples of 30 trophozoites approaching maturity have been examined for each sex and for each species.

The significance of differences has been tested with STUDENT's *t*. *Intensity* and *typical character* (GINI's « typicité ») of sexual differences have been calculated in order to rank the characters of each species in a decreasing order according sexual dimorphism. An overall extimate of sexual dimorphism has been reached by the pouled means of intensity and « typicité » of the 11 characters. These results are compared with the ones obtained for three other species of gregarines praeviously analised.

A marked sexual dimorphism has been found for both species. In both cases it could be possible to recognise primites and satellites separated from biassociations. That shows that a sexual dimorphism *sensu stricto* is much more common amongst gregarines that it was praeviously thought.

Intensity and « typicité » of sexual differences for each character differ these two species; some character shows reverse relation to sexuality. That shows that, in spite of a close taxonomic affinity, there is not parallelism in the development of sexual differences. The sexual dimorphism seems to have undergo indipendent evolution in the two studied species; as a consequence, examination of one species does not allow predictions about sexual dimorphism of other even closely related species.

BIBLIOGRAFIA

BULLOUGH, W. S. (1951): « Practical invertebrate anatomy ». Macmillan, London 1951.

DOFLEIN, F. e REICHENOW, E. (1953): « Lehrbuch der Protozoenkunde ». Fischer, Jena, 1953, p. 810.

ELLIS, M. M. (1913): « A descriptive list of the cephaline gregarines of the new world ». *Trans. Amer. Micr. Soc.*, *32*, 259-296.

FILIPPONI, A. (1948): « *Gigaductus macrospora* n. sp. Revisione del genere *Gigaductus*. Istituzione della nuova famiglia *Gigaductidae* (*Gregarinida*) ». *Arch. Zool. It.*, *33*, 293-331.

FILIPPONI, A. (1951): « Contributo alla conoscenza di *Gigaductus elongatus* (*Gregarinida, Gigaductidae*) ». *Rend. Ist. Sup. Sanità*, *14*, 800-823.

FILIPPONI, A. (1953): « Sviluppo trofico, estensione e posizione sistematica del genere *Gigaductus* ». *Riv. Parass.*, *14*, 69-84.

FILIPPONI, A. (1954): « Sul dimorfismo sessuale nelle Gregarine » *Riv. Parass.*, *15*, 7-36.

GRASSÉ, P. P. (1953): « Traité de Zoologie ». Tome I, fasc. 2, Masson, Paris, 1953, p. 648.

MORIGGI, M. (1943): « Nuove gregarine policistidee parassite di carabidi italiani ». *Arch. Protistisvenkde*, *98*, 221-234.

WATSON, M. E. (1916): « Studies on Gregarines, I ». *Illinois Biol. Monogr.*, *2*, (3), I-258.

WATSON, M. E. KAMM (1918): « New Gregarines from Coleoptera ». *J. Paras.*, *4*, 159-163.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

COMPORTAMENTO DEI COMPONENTI PROTEICI DEL SIERO DURANTE L'ATTACCO PRIMARIO NEI RATTI INFETTI DA *PLASMODIUM BERGHEI*

AUGUSTO CORRADETTI, GIOVANNI TOSCHI, FELICE VEROLINI (*)

Le infezioni da plasmodi appaiono particolarmente adatte per lo studio delle relazioni tra andamento patologico, sviluppo dei fenomeni immunitari dell'ospite e comportamento delle frazioni proteiche del siero lungo il decorso dell'infezione stessa.

Infatti nelle infezioni da plasmodi è in ogni momento possibile valutare, sulla base del decorso e dell'esame parassitologico del sangue, le condizioni patologico-immunitarie in cui si trova l'ospite.

Indagini in questo campo, in scala sufficientemente ampia, sono ora state rese possibili dall'introduzione del micrometodo di elettroforesi su carta (1), che permette di compiere, in tempo relativamente breve e parallelamente, la determinazione delle frazioni proteiche di un notevole numero di sieri, utilizzando le minime quantità di sangue prelevabili sui piccoli animali.

In un vasto piano di ricerche ci proponiamo di affrontare vari problemi relativi ai rapporti tra proteine del siero e differenti condizioni patologico-immunitarie in infezioni da diverse specie di plasmodi. Il presente lavoro che apre la serie degli studi sull'argomento, si riferisce al comportamento dei componenti proteici del siero durante l'attacco primario da *Plasmodium berghei* nel ratto.

L'infezione da *P. berghei* nel ratto che, come è noto, dimostra nel decorso successivo relazioni patologico-immunitarie del tutto particolari (2), non presenta invece nell'attacco primario divergenze sostanziali dal comportamento degli altri plasmodi nelle infezioni indotte con inoculazione di sangue. Come per gli altri plasmodi, all'inoculazione segue un progressivo aumento

---

(*) *Istituto Superiore di Sanità.*

numerico dei parassiti fino a raggiungere, se non sopravviene la morte, un acme, cui segue una crisi parassitolitica che in 1-3 giorni porta a una riduzione enorme del numero dei parassiti.

Il periodo da noi studiato corrisponde quindi al periodo di accrescimento numerico dei parassiti fino al momento in cui in genere si verificano le condizioni immunitarie che determinano la crisi parassitolitica.

Materiale e metodi.

Si sono impiegati ratti maschi del peso di 150-200 gr., dell'allevamento del nostro Istituto (ceppo Wistar-Glaxo) alimentati con regime di Mac Collum integrato con fegato fresco e verdura.

In ciascuno dei quattro esperimenti eseguiti si è impiegato un gruppo di ratti (4, 6 o 8; vedi tabelle) dei quali si è seguito contemporaneamente il decorso della infezione ed il quadro elettroforetico del siero.

L'infezione si è determinata mediante inoculazione intraperitoneale di 0,2 cc. di sangue citratato prelevato a ratto infetto da *Plasmodium berghei*. Il decorso dell'infezione si è seguito con esame quotidiano dello striscio di sangue.

Il prelievo di sangue per l'elettroforesi del siero si è eseguito circa sette giorni prima della inoculazione e poi nei giorni di infezione come è indicato nelle tabelle (4°, 8°, 16° ovvero 6°, 12°). Si è adottata la tecnica di prelievo proposta da Halpern e Pacaud (3), mediante puntura del plesso oftalmico con adatta pipetta paraffinata; il sangue (cc 0,8 - 1,4) viene immediatamente trasferito in provettina paraffinata e centrifugato per tre minuti a 3000 giri/min. Si ottiene così la separazione del plasma senza alcuna emolisi; il plasma coagula immediatamente ed il coagulo è agevolmente distaccabile dalla parete con bacchettina di vetro ottenendosi così, dopo nuova centrifugazione per un minuto, a 3000 giri/min., il siero limpido.

L'elettroforesi si è eseguita lo stesso giorno, contemporaneamente e in parallelo per tutti i sieri di uno stesso prelievo, mediante il procedimento di elettroforesi su carta descritto da Grassmann e Hannig (4). Si è impiegato un tampone di veronal-acetato di pH 8,6 e forza ionica $\mu = 0,1$ (Wiedmann): veronal sodico g. 5,88; sodio acetato cristallino g. 3,88; potassio ossalato cristallino g. 1,38; HCl n/10 cc 20; acqua distillata litri uno. L'elettroforesi, con striscie di carta Whatman No 1 (cm. 4 per 30), è durata 17 ore con 4,5 V/cm., tranne nell'esperimento n. 1 (durato 10 ore). Si depongono sulla striscia cc. 0,02 circa di siero. Le striscie seccate a 110° si colorano per 15 minuti con Amidoschwarz 10B (Bayer): soluzione al 0,5% in: metanolo 90%, acido acetico 10%. Si lava ripetutamente con: metanolo 50%, acido acetico 10%, acqua distillata 40%. Il tracciato elettroforetico si ottiene mediante lettura diretta delle striscie in adatto

densitometro a cellula fotoelettrica (*), previa diafanizzazione delle striscie con una miscela di olio di vasellina e monobromonaftalina (2/1). La percentuale delle diverse frazioni si è valutata in base alla misurazione delle relative aree fatta con un planimetro sul tracciato opportunamente ingrandito. Nei sieri così frazionati abbiamo determinato i valori percentuali delle seguenti frazioni: albumina; α globulina (che risulta composta di due gradienti α_1 e α_2); β globulina (analogamente β_1 e β_2); e γ globulina.

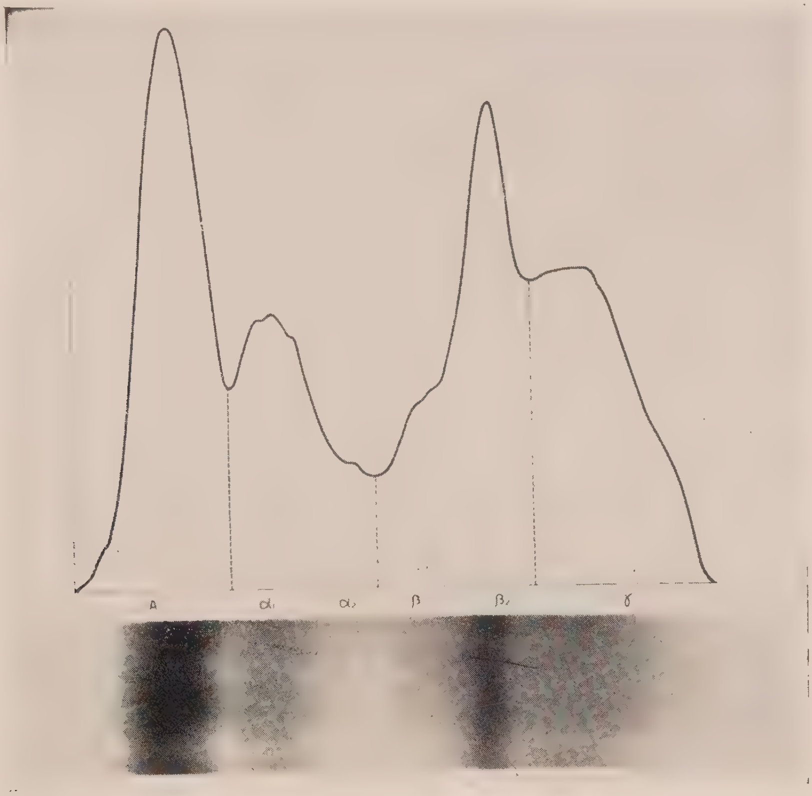


Fig. 1.

Tracciato elettroforetico del siero di ratto normale. Elettroforesi in tampone Veronal-acetato di pH 8,6 e $\mu = 0,10$, *durata 17 ore con 4,5 V/cm.*

In ogni singolo esperimento si sono determinati, nel gruppo di ratti esaminati, il valore medio delle singole frazioni e il relativo Errore Standard; i valori osservati nel prelievo precedente l'infezione si sono confrontati con quelli osservati nel corso dell'infezione; la significatività delle differenze ri-

(*) Si è usato l'apparecchio di elettroforesi e lettura della ditta Label, Roma.

TABELLA 1.

Frazioni proteiche nel siero di ratti ai giorni 2°, 6°, 12° di infezione da P. berghei.

Giorno di infezione	Numero dei ratti	A % Media (±Errore Standard)*	α %	β + γ %
0 **	4	29,62 (± 3,66)	23,78 (± 1,05)	46,57 (± 2,60)
2	4	27,35 (± 3,40)	23,49 (± 1,92)	49,14 ± (2,30)
6	4	32,94 (± 1,67)	18,95 (± 1,07) t***=3,20 . 0,02>P>0,01	48,08 (± 1,22)
12	4	27,29 (± 2,10)	16,45 (± 0,36) t = 6,56 . P < 0,01	56,24 (± 2,44) t = 2,71 . 0,05>P>0,02

* Errore Standard $= \sqrt{\dfrac{S\,x^2}{n\,.\,(n-1)}}$ (Snedecor, G. W., "Statistical Methods" pag. 61, Jowa State College Press. Ames, Jowa. 1948).

** Prelievo effettuato 6 giorni prima della inoculazione.

*** $t = \bar{x} \sqrt{\dfrac{n\,(n-1)}{S\,x^2}}$ (Snedecor, G. W., ibidem, pag. 77)

TABELLA 2.

Frazioni proteiche nel siero di ratti ai giorni 4°, 8° e 16° di infezione da P. berghei.

Giorno di infezione	Numero dei ratti	A % Media (± Errore Standard)*	α %	β %	γ %
0	6	40,97 (± 2,06)	19,03 (± 0,87)	24,38 (± 1,67)	15,60 (± 1,05)
4	6	37,64 (± 2,27)	17,63 (± 1,55)	28,68 (± 1,34)	16,00 (± 0,95)
8	6	41,75 (± 2,23)	12,77 (± 0,99) t**= 4,72 . P<0,01	28,22 (± 1,13)	17,20 (± 1,36)
16	5	39,34 (± 2,02)	10,34 (± 2,41) t***=3,64 P<0,01	27,52 (± 2,21)	23,10 (± 2,33) t***=3,12 . P<0,01

* Errore Standard $= \sqrt{\dfrac{S\,x^2}{n\,(n-1)}}$

** $t = \bar{x} \sqrt{\dfrac{S\,x^2}{n\,(n-1)}}$

*** $t = \bar{x} \sqrt{\dfrac{n_1\,n_2\,(n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2)\,S\,x^2}}$ Snedecor G. W., "Statistical Methods", pag. 82, Jowa State College Press, 1948.

scontrate si è valutata con il Test « t » di Fisher. Negli esperimenti N. 4 e N. 5 si è determinato anche l'N totale del siero, mediante colorimetria con il reattivo di Nessler, secondo il procedimento di KING (5).

Si è istituito inoltre un esperimento di controllo (N. 5) nel corso del quale un gruppo di 8 ratti è stato sottoposto alle stesse condizioni sperimentali. L'inoculazione è stata però effettuata con sangue di ratto normale. Il prelievo del sangue e l'elettroforesi del siero si è eseguita agli stessi intervalli di tempo degli animali infetti (come quelli dell'esperimento n. 4).

RISULTATI.

L'aspetto tipico di un tracciato elettroforetico normale da noi ottenuto è illustrato in Fig. 1. L'aspetto del tracciato ed i valori percentuali delle diverse frazioni si accordano, di massima, con i dati di altri ricercatori (ANTONINI e PIVA [6]; MARTINI e RIVA [7]). Dobbiamo osservare che abbiamo riscontrato costantemente e regolarmente, nei ratti normali, un valore percentuale di albumina particolarmente basso rispetto ai dati di questi Autori.

Esperimento N. 1.: V. Tabella 1.

In questo esperimento, per motivi inerenti alla tecnica di elettroforesi (che è durata solo dieci ore) si è valutata la percentuale complessiva delle frazioni $\beta + \gamma$.

La percentuale delle α globuline scende dal 23,78 % al 18,95 % (6° giorno) e al 16,45 % (12° giorno); la differenza è altamente significativa ($P < 0{,}01$). La frazione $\beta + \gamma$ al 12° giorno di infezione mostra un aumento dal 46,57% al 56,24 % che risulta significativo ($0{,}05 > P > 0{,}02$).

Esperimento N. 2.: V. Tabella 2.

Si osserva anche qui una diminuzione delle α globuline, il cui valore percentuale scende dal 19,03 % al 12,77 % (8° giorno) e al 10,34 % (16° giorno). La percentuale delle γ globuline sale, il 16° giorno, al 23,10 %, rispetto al valore iniziale 15,60 %. Queste differenze sono altamente significative ($P < 0{,}01$).

Esperimento N. 3: V. Tabella 3.

Anche in questo esperimento, condotto con un maggior numero di animali (8) si osserva al 12° giorno un aumento della percentuale delle γ globuline che dal valore iniziale del 23,41 % sale al 28,48 %; la differenza è altamente

TABELLA 3.

Frazioni proteiche nel siero di ratti ai giorni 6°, 12° di infezione da P. berghei

Giorno di infezione	Numero dei ratti	A % Media (± Errore Standard)*	α %	β %	γ %
0	8	32,03 (± 1,77)	17,22 ± 0,59)	27,36 (± 1,55)	23,41 (± 1,19)
6	8	28,33 (± 1,57)	17,93 (± 1,19)	30,07 (± 1,18)	23,67 (± 1,54)
12	7	27,70 (± 2,41) $t^{**} = 4{,}23$. $P < 0{,}01$	17,22 (± 1,51)	26,60 (± 1,16)	28,48 (± 1,00) $t = 3{,}49$. $P < 0{,}01$

* Errore Standard $= \sqrt{\frac{n \cdot (n-1)}{S\,x^2}}$

** $t = \bar{x}\sqrt{\frac{n_1\, n_2\, (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2)\, S\,x^2}}$

significativa (P < 0,01). Non si osserva invece la diminuzione delle α globuline, mentre vi è una lieve, ma significativa diminuzione dell'albumina (dal 32,02 al 27,70 %).

Esperimento N. 4: V. Tabella 4.

Anche in questo esperimento, condotto del pari con 8 animali, si osserva in 12ª giornata l'aumento percentuale delle γ globuline dal valore iniziale di 22,89 % al 30,01 %; la percentuale delle α globuline scende dal 19,48 % (valore iniziale) al 15,05 % (12ª giorno). Le differenze sono altamente significative (P < 0,01). L'N totale del siero non ha presentato variazioni significative.

Esperimento N. 5 (controllo): V. Tabella 5.

In questo gruppo di controllo non si sono verificate, nel corso del periodo di osservazione, variazioni significative della percentuale delle diverse frazioni proteiche. Dobbiamo solo rilevare una diminuzione lieve ma significativa dell'N totale al 6° giorno dalla inoculazione di sangue di ratto normale; tale variazione non è più riscontrabile al 12° giorno.

DISCUSSIONE.

Le variazioni del quadro elettroforetico del siero presentano nei quattro esperimenti una sostanziale uniformità. La caratteristica comune è l'aumento del valore percentuale delle γ globuline, osservato dopo 12 giorni di infezione (in un caso dopo 16). Tale aumento non raggiunge valori elevati, ma all'analisi statistica risulta altamente significativo (P < 0,01), e si verifica

TABELLA 4.

Azoto totale e frazioni proteiche nel siero di ratti ai giorni 6° e 12° di infezione da P. berghei.

Giorno di infezione	Numero dei ratti	N totale Media (± Errore Standard) *	A %	α %	β %	γ %
0	8	5,48 (± 0,119)*	29,04 (± 2,45)	19,48 (± 1,26)	28,59 (± 1,59)	22,89 (± 1,58)
6	8	5,90 (± 0,148)	27,74 (± 1,50)	16,66 (± 0,63)	28,92 (± 1,04)	26,67 (± 1,56)
12	8	5,11 (± 0,238)	28,34 (± 2,05)	15,05 (± 0,06) $t^{**} = 3{,}163$. $P < 0{,}01$	26,59 (± 1,07)	30,01 (± 1,38) $t^{**} = 3{,}385$. $P < 0{,}01$

* Errore Standard $= \sqrt{\frac{S\,x^2}{n\,(n-1)}}$

** $t = \bar{x} \sqrt{\frac{n\,(n-1)}{S\,x^2}}$

TABELLA 5.

Azoto totale e frazioni proteiche nel siero di ratti ai giorni 6° e 12° dalla inoculazione di sangue di ratto non infetto (esperimento di controllo).

Giorno dalla inoculazione	Numero dei ratti	N Totale mg. per 100 cc. Media	(± Errore Standard)*	A %		α %		β %		γ %	
0	8	891	(± 46,10)	36,36	(± 1,67)	18,68	(± 0,98)	24,58	(± 0,92)	20,37	(± 1,91)
6	8	690	(± 36,05)	32,31	(± 2,71)	20,96	(± 0,95)	27,30	(± 1,88)	19,42	(± 1,29)
12	8	818	(± 30,39)	33,33	(± 1,60)	22,80	(± 2,44)	22,90	(± 1,19)	20,94	(±1,32)

* Errore Standard $= \sqrt{\frac{S\,x^2}{n\,(n-1)}}$

con regolarità in tutti e quattro gli esperimenti. La diminuzione della percentuale delle α globuline si verifica in tre esperimenti su quattro ed in due di essi compare fin dal 6° giorno di infezione. Solo in un esperimento si è osservata una diminuzione della percentuale di albumina, di lieve entità. Non si sono osservate variazioni significative dei valori dell'N totale del siero nel corso dell'esperimento No 4 in cui tale valutazione è stata eseguita. Nel corrispondente esperimento No 5 (esperimento di controllo) non si sono verificate variazioni significative delle frazioni del siero; solo al 6° giorno si è osservata una lieve diminuzione dell'N totale, che non era più riscontrabile al 12°. Considerando queste variazioni del quadro elettroforetico del siero in rapporto con il decorso dell'attacco primario, dobbiamo rilevare che l'aumento delle γ globuline si è osservato in quel periodo dell'attacco primario in cui di regola si determina la crisi parassitolitica. Ci proponiamo, con ulteriori esperimenti, di studiare in modo più approfondito i rapporti tra l'aumento delle γ globuline e lo svolgimento della crisi parassitolitica.

RIASSUNTO

Sono state studiate in 4 esperimenti su un numero complessivo di 26 ratti le variazioni dei componenti proteici del siero durante l'attacco primario nei ratti infetti da *Plasmodium berghei*.

Il quadro elettroforetico ha dimostrato un aumento del valore percentuale delle γ globuline al 12° e al 16° giorno dall'inoculazione, in corrispondenza cioè del periodo in cui di regola si produce la crisi parassitolitica. Non si sono osservate variazioni significative dei valori dell'N totale del siero, negli esperimenti in cui tale valutazione è stata eseguita. Il quadro elettroforetico degli animali di controllo non ha presentato variazioni significative delle diverse frazioni proteiche.

SUMMARY

The behaviour of the serum proteins was followed during the primary attack on 26 rats infected with *Plasmodium berghei*. The electrophoretic pattern showed a raise in the percentage of the -globulins at the 12th and 16th days from inoculation, i.e. in correspondence to the usual period of parasitolytic crisis. No significant variations of the serum total N was observed in those rats which were tested for it. The electrophoretic pattern of control rats showed no significant variations of the different protein fractions.

BIBLIOGRAFIA

1) ANTONINI F. M. e PIVA G. (1953): L'elettroforesi su carta, metodo e dati sperimentali. *Recenti Progressi in Medicina*, *41*, 243.

2) CORRADETTI A. (1950): Particolari fenomeni immunitari nell'infezione da *Plasmodium berghei*. *Riv. di Parass.*, *9*, n. 4, 201.

3) Halpern B. N. e Pacaud A. (1951): Technique de prelèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de Laboratoire par ponction du plexus ophtalmique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* (Paris), *145*, 1465.
4) Grassmann W. e Hannig K. (1952): Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *H. S. Zeitschr. f. physiol. Chem.*, *290*, 1.
5) King E. G. (1947): Microanalysis in Medical Biochemistry, Churchill ltd. London.
6) Antonini F. M. e Piva G. (1952): Il frazionamento elettroforetico del siero di alcuni animali., *Boll. S.I.B.S.*, *28*, 1887.
7) Martini V. e Riva G. (1953): Ricerche comparative sull'elettroforesi in fase libera (Tiselius) e su carta., *Giorn. Biochimica*, *2*, 166.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR *UNCINARIA STENOCEPHALA*, RAILLIET, 1884

E. LAGRANGE (*)

En Belgique, l'*Ancylostoma caninum* sévit sur les chiens de meute, mais comme il n'existe plus guère que cinq meutes dans tout le pays, ce parasite, assez malfaisant d'ailleurs, est plutôt rare.

Au contraire, l'*Uncinaria stenocephala*, son proche parent, dont les oeufs ressemblent d'une façon parfaite à ceux de l'*Ancylostoma* est assez fréquent et répandu chez les chiens de rue. Sur 100 chiens pris au hasard des entrées à la Fondation voici les proportions d'infestés. 50 donnent à l'examen microscopique direct des déjections 12 infestations la plupart très discrètes, avec I à 2 oeufs par préparation. 3 seulement donnent plus de 50 oeufs en une seule préparation.

Dans une 2é série de 50, 7 sont positifs à l'examen microscopique, alors que la lévigation à l'eau salée décèle 11 infestations. Au total sur 100 chiens, 23 ont été trouvés infestés. J'ai trouvé dans la litterature deux cas d'infestations humaines par *Uncinaria stenocephala*, signalés par Fülleborn (1) et Aage Astrup (2) et observés d'ailleurs dans des conditions très particulières.

La lévigation ou « direct flotation » a été pratiquée de la maniére suivante: Dans 20 à 40cc d'eau salée à 21%, on émulsionne gros comme un gros pois de matières fécales. Il faut surtout éviter de prendre trop de matières!

Au bout d'1/4 d'heure et d'une 1/2 heure, on prelève au moyen d'une anse flambée, quelques gouttelettes en surface de la suspension imparfaitement sédimentée que l'on examine à la loupe binoculaire ou au faible grossissement du microscope, soit au grossissement de 30 ou de 150 diamètres. La méthode peut donc être appliquée dans un simple tube à essai et avec le matériel le plus simple. Les oeufs d'*Ascaris* et de Cestodes viennent flotter avec ceux d'*Uncinaria*.

Clayton Lane (3) a longuement discuté les mérites et les inconvénients des

---

(*) *Fondation médicale Reine Elisabeth. Jette. Bruxelles.*

méthodes d'enrichissement des oeufs d'ankylostomes. La méthode de lévigation proposée ici a le mérite de la simplicité et n'est guère plus longue que l'examen microscopique direct. Elle évite les méthodes compliquées d'enrichissement. Son principal inconvénient est que la verrerie ayant servi à un examen positif risque, si elle n'est pas très soigneusement lavée, de conserver des oeufs pour un examen ultérieur. Elle aurait plutôt l'inconvénient d'être trop sensible et de déceler des infestations trop légères pour provoquer des symptômes morbides. Elle est en tous cas beaucoup plus rapide que la culture dont il sera question plus loin.

L'action pathogène d'*Uncinaria* est d'ailleurs tres faible d'après mes observations. Sur un chien dont les fèces présentaient de nombreux oeufs, l'autopsie m'a permis de récolter 796 *Uncinaria* adultes. Or le chien était en parfaite santé et ne présentait pas de lésions locales. Un autre chien, où j'ai compté 557 adultes paraissait également en parfait état. Un 3è, mort après choc peptonique a donné 550 vers adultes. Le duodenum est hémorragique avec des suffusions sanguines diminuant vers le coecum. Pour opérer cette récolte, j'ai eu recours au procédé suivant. Le chien infesté est sacrifié. L'intestin grêle est enlevé *in toto* et mis pour la nuit à la glacière ou au frigorifique. Le lendemain matin, on abouche à un robinet le pylore, on fait passer de l'eau par l'intestin et on recuille ce qui sort. On pratique ainsi 3 lavages successifs de l'intestin, chacun avec environ 2 litres d'eau, et dans les eaux de lavage on recuille les nématodes la plupart encore vivants.

Dans lo 2d cas cité, on récolte ainsi successivement 461, 76 et 20 parasites.

Plusieurs chiens ont été tenus en observation en cage pendant plusieurs mois à la suite de l'observation suivante.

Le chien II examiné le 1er-juillet 1953 présente oeufs d'*Uncinaria* dans une préparation microscopique. Les examens sont répétés aux dates suivantes avec les chiffres indiqués entre parenthèses:

8 juillet (27), 10 juillet (71), 11 septembre (38), 25 septembre (29), 29 septembre (16, oeufs non fécondés), 23 octobre (0). Quelques jours auparavant, le chien a émis spontanément un grand nombre d'*Ascaris*, le 26 octobre (0, oeufs très rares après lévigation)

Le 21 novembre, le chien est sacrifié. Dans le contenu intestinal, on trouve 51 *Ascaris* et 20 *Uncinaria* dont 9 mâles. Par lévigation, j'obtiens dans les matières fécales de nombreux oeufs d'*Ascaris* et 2 d'*Uncinaria*.

On pouvait se demander à la suite de cette observation, si par la captivité et l'impossibilité de réinfestation, le chien arrivait à se guérir.

De nouvelles tentatives ont été poursuivies sur 3 chiens. Elles ne permettent pas de généraliser cette hypothése. Dans deux autres cas cependant, les oeufs très abondants au début, sont devenus plus rares dans les déjections aprés 3 à 4 mois de captivité.

***

La culture des déjections a fait l'objet de nombreux travaux en ce qui concerne l'*Ancylostoma*. Elle a pour but notamment d'apporter au diagnostic plus de précision que l'examen direct. Elle permet également d'étudier la prophylaxie sans toutefois que cette étude ait jusqu'à présent donné des résultats bien tangibles. Cinquante ans après la découverte du *Necator americanus*, les statistiques des Etats du Sud montrent que les « Hookworms » n'ont pas entièrement disparu des Etats-Unis malgré les mesures d'hygiène.

Au cours de mes essais, j'ai tout d'abord essayé les méthodes devenues classiques pour l'*Ancylostoma*. Renonçant bientôt aux méthodes d'enrichissement préalable, j'ai opéré d'abord de la façon suivante.

Dans une boîte de Petri ou dans de simples boîtes à sardines recouvertes d'une plaque de verre, on dépose au fond de 2 à 3 épaisseurs de papier buvard. En quantité égale, de la terre de jardin stérilisée et des matières fécales sont mélangées au mortier, additionnées de quelques gouttes de solution de sulfate de cuivre (pour combattre la prolifération des moisissures). On les met pour 4 à 5 jours dans une étuve à 25°. Puis on renverse le tout dans un entonnoir (appareil de Baermanni fermé avec une pince à son extrémité inférieure. On remplit l'entonnoir d'eau chaude à 45° jusqu'à recouvrir la masse fécale qui y est déposée, en ayant soin de garnir l'entonnoir d'un morceau de tulle qui laisse passer les larves et retient les débris fécaux.

Après 1, 2, 4 et 20 heures, en desserrant la pince, on prélève des échantillons du fond de l'entonnoir où grouillent les larves. Laissées à sédimenter dans des tubes de Borrel, celles-ci peuvent être lavées à l'eau ordinaire et conservées pendant plusieurs mois, sans autre précaution, à la température du laboratoire et à l'ombre, pour l'une ou l'autre expérience.

Après avoir essayé cette méthode classique, j'ai constaté aprés E. Brumpt (6) qu'il est inutile d'ajouter de la terre aux matières fécales. A condition d'avoir des fèces suffisamment moulées et sèches, on évite parfaitement la putréfaction qui empêche l'éclosion.

J'ai également essayé la méthode de E. Brumpt (7) qui consiste à recuellir les matières dans une terrine d'argile ou dans un petit cristallisoir de verre, baignant dans de l'eau ordinaire. Au bout de 6 à 8 jours, les larves écloses sortent du cristallisoir et se retrouvent nageant librement dans l'eau extérieure. Cette méthode m'a paru donner une récolte de larves moins abondante que la culture suivie du passage à l'entonnoir de E. Baermann, décrite plus haut, et qui présente un maximum de simplicité.

L'addition d'eau aux déjections de façon à réaliser une culture liquide suffit à arrêter l'éclosion des oeufs d' *Uncinaria*. Par contre, les oeufs recueillis après lévigation et reportés en eau ordinaire et par conséquent lavés du milieu fécal, se développent parfaitement en milieu liquide. C'est

donc la putréfaction des déjections en milieu liquide qui empêche l'éclosion des oeufs. L'addition d'eau fécale à des oeufs lavés au préalable empêche leur éclosion. Le fait avait été déjà signalé en 1879 par GRASSI et PARONA: «Nelle feci liquide o diarroïche le uova dell'anchilostoma non si sviluppano». Dans tout ceci l'*Uncinaria* se comporte comme les *Ancylostoma*. Il y a cependant une différence radicale qui explique l'épidémiologie de l'*Uncinaria*: c'est la résistance aux températures inférieures.

J'ai lavé à l'eau de robinet des oeufs recuillis en masse par lévigation et les ai portés à des températures descendant jusqu'à -3°C. A la longue, l'éclosion se produit. Voici quelques essais:

Un tube de Borrel contenant de nombreux oeufs est mis à la glacière (t 3°C). De jour en jour, je pratique des prélèvements qui sont maintenus à 25°-27°.

Après	24 h. de glacière, et 24 h. à 25°-27°		100% d'éclosions.
»	48 h.	id.	id. »
»	3 j.	id.	id. »
»	6 j.	id.	90% »
»	8 j.	id.	95% »
»	17 j.	L'éclosion de 50% des oeufs s'est faite à la glacière.	
»	22 j.	Les autres éclosent dès le lendemain à 100 % quand ils sont	
»	29 j.	portés à 25°.	

Dans un autre essai, 80 % sont éclos en glacière en 48 heures.

A -3°C les éclosions réussissent moins bien.

Dans une expérience, jusqu'après 27 jours de frigo, pas d'éclosion.

Après 30 jours de séjour en frigo, l'échantillon est apporté au laboratoire où éclosent à peine 3% des oeufs, même après plusieurs jours.

Dans un autre essai, l'éclosion est également nulle à —3°, mais 25% des oeufs éclosent au laboratoire en 48 h après 34 jours de frigo.

Cette résistance au froid, qui n'a pas été observée avec les *Ancylostoma* explique que les *Uncinaria* se propagent chez le chien, là où l'*Ancylostoma* ne peut le faire. D'après CLAYTON LANE, OLIVER (8) a pu faire revivre des oeufs d'ankylostome congelés et ne voit pas éclore les oeufs conservés 10 semaines à 15-17°C; bien qu'ils soient vivants et éclosent après réchauffement. BRUNS (9) est du même avis à condition que la congélation n'ait pas duré plus de 48 h. PERRONCITO (1886) affirme que le développement des larves au stade infectieux ne se produit pas en dessous de 12°C. et BOYCOTT et HALDANE (1904) disent 13° à 16°.

La survie des larves d'Ankylostome est très longue et a pu être observée après 18 mois par NICOLL (1917) dans de l'eau ordinaire ou dans le sable humide.

J'ai observé des larves vivantes d'*Uncinaria*, tenues à la température

du laboratoire à l'ombre (+20°) dans l'eau après 4 mois. Elles étaient en petit nombre. Après 2 mois, les larves maintenues dans les mêmes conditions étaient encore en pleine vitalité et présentaient un mouvement continu.

Il faut remarquer que cette survie ne se manifeste que chez les larves écloses en milieu fécal. Les larves écloses d'oeufs lavés, quelle que soit la température, meurent en quelques jours.

Action de divers facteurs sur l'éclosion.

NaCl. On prélève des oeufs d'*Uncinaria* concentrés par lévigation, et au moyen d'une anse, on les porte dans des solutions de NaCl à 2, 5, 10 et 20% à la température du laboratoire. Dans les deux premières solutions, les oeufs tombent au fond. A 10%, ils restent indifférents, à 20% ils flottent à la surface.

Après 24 h. ceux venant de solutions à 2 et 5% sont éclos et les larves sont mobiles; ceux provenant de 10% ont de rares éclosions. Dans le dernier tube (20%) aucune éclosion. Après 48 h. de contact, ceux ayant séjourné dans 10 et 20% de NaCl éclosent à raison de 50% lorsqu'ils sont lavés et mis en eau pure.

Le chlorure de sodium a donc une toxicité beaucoup plus faible pour les oeufs que pour les larves.

Urine humaine. On recueille des oeufs d'*Uncinaria*, à la température du laboratoire (+18°) dans de l'urine pure et diluée à 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/100, 1/200.

Dans les 3 premiers tubes, pas d'éclosions, urine en putréfaction le lendemain. Dans les 2 suivants, rares éclosions apres 24 h. Après 48 h. la dilution à 1/20 donne 40% d'éclosions, avec larves mortes. Dans les 2 derniers, pratiquement toutes les larves sont écloses après 24 h. et apparaissent bien vivantes, encore après 3 jours.

Les larves portées dans l'urine pure, sont pratiquement toutes mortes après 24 heures.

Urée. Dans une solution d'urée à 10%, 90% des oeufs sont éclos le lendemain et les larves sont mortes. Les autres 10% sont des larves non écloses, mais prêtes à l'éclosion dans la coque de l'oeuf.

En solution à 2,5%, tous les oeufs sont éclos, et les larves sont vivantes.

Peptone Difco. Dans 2 et 1% de peptone, les oeufs n'éclosent pas. Après 24 h. le liquide est putréfié. En 2, 1 et ½% rares éclosions, les larves sont mortes après 24 h. Toutes ces inhibitions peuvent être rattachées à la putréfaction du milieu, et se manifestent également en eau de matières fécales.

Lait. Les oeufs déposés dans du lait pur ou dilué n'éclosent pas, même si le lait est dilué jusqu'au 1/15e, et même s'il est additionné de bicarbonate de Na (pH 8).

L'addition au lait d'un tampon (acide citrique + phosphate) pH 7 ne

modifie pas l'inhibition. Le tampon a lui seul a une action inhibitrice nette, même dilué au 1/8.

Petit lait. Le petit lait, même dilué au 1/4 empêche l'éclosion. Après 24 h de contact lavés à l'eau ordinaire, les oeufs éclosent à 100% en 48 h.

Sérum. Même dilué au 1/10, le sérum humain empêche l'éclosion des oeufs. Après lavage les oeufs, même ayant subi le contact pendant 3 semaines, éclosent encore. Les larves mises en présence de lait ou de sérum, après éclosions, résistent plusieurs jours et sont mortes après 5 jours.

D'une façon générale, l'oeufs est donc plus résistant à divers facteurs toxiques que la larve bien qu'il ne représente qu'un état temporaire alors que la larve semble adaptée à une vie prolungée.

***

La survie des larves d'Ankylostome est remarquable. Elle se manifeste dans un milieu pauvre, notamment dans l'eau ordinaire, à température moyenne (10 à 20°) de préférence à l'ombre ou dans l'obscurité. La larve d'*Uncinaria* semble obéir au même déterminisme.

Il semble que ce soit LAMBINET (10) qui ait le premier cherché à détruire les larves d'ankylostome dans un but prophylactique, au moment des épidémies qui se développaient dans le bassin minier de Belgique. D'emblée il constate que les antiseptiques habituels sont peu efficaces, Depuis lors, il est difficile de faire l'inventaire complet de tous les auteurs qui ont cherché par des poisons larvicides à combattre l'endémie d'ankylostomes dans les pays tempérés ou tropicaux. Citons seulement ceux qui pour des raisons diverses apportent des aperçus nouveaux. Dans l'imposante série composant la monographie de W. W. CORT et ses collaborateurs (11) de la mission John Hopkins à Trinidad, D. L. AUGUSTINE examine notamment la toxicité comparée pour la 2e larve de *Necator* munie ou privée de sa gaine. Les dilutions essayées d'acide phénique à 1%, de formol à 1 et 10%, de sublimé a saturation, montrent combien est grande la résistance des larves. I. W. PARNELL (12) étudiant les nématodes parasites essaie 10 produits azotés. La chloropicrine, d'une manipulation dangereuse, stérilise 2300 fois son poids de déjections fraiches. Ce rapport tombe à 400-500 fois avec l'aniline, le cyanure de calcium et la pyridine.

G. PENSO (13) tue les larves en moins de 5 heures avec de la calciocyanamide et du sulfate de fer jusque 1/2500.

J. E. ACKERT et LIGENZOWSKI F. L. (14) qui donnent une bibliographie importante de la question emploient 10% d'acide acétique, d'acide trichloracétique, d'acide lactique, pour obtenir une réduction massive des cultures. Il faut 25% de sulfate ammonique, de nitrate de sodium pour tuer les larves.

On sait d'autre part notamment par MANOUVRIEZ (1905), BOYCOTT et HALDANE

(1903) que 2 à 3% de NaCl suffisent à tuer les larves, LAMBINET réclamait 4% de NaCl.

J'ai entrepris des essais avec diverses substances supposées toxiques telles que insecticides, fongicides, herbicides au nombre de 125. Ne retenant que les substances qui tuent les larves endéans les 24 heures en solution de 1/1000 ou plus diluée encore; j'ai constaté la mort des larves par les produits suivants: E. 605, Selor D, Rotenone, Naphtol B, arséniate de Plomb. La Santonine tue au 1/2000, le violet de gentiane et l'hypobromite de Na au 1/5000. La nicotine technique tue les larves au 1/10.000 en moins de 24 heures et le liquide de Lugol au même titre en 3 à 4 heures à la température de 20°.

En présence de ces résultats, j'ai systématiquement exploré à propos de la nicotine, d'autres alcaloïdes, des dérivés de la pyridine et la pyridine elle-même, des insecticides, sans observer de résultats comparables avec aucun d'entre eux.

Le liquide de Lugol (KI_3) a été l'objet de recherches comparées avec les divers poly-iodures, la peptone iodée, les iodates et periodates, sans donner de résultats comparables. L'iodure de potassium ayant peu d'action sur les larves d'*Uncinaria*, même au 1/100, il n'y a donc pas lieu de tenir compte de l'iode lui-même. Le trichlorure d'iode tue les larves au 1/5000 en 20 h. La teinture d'iode fraîche ne tue pas en dilution au 1/5000. L'alcool à 5 et à 10% ne tue pas les larves après plusieurs heures de contact. L'action du liquide de Lugol (dont les proportions classiques comportent 2 grammes de KI, 1 gr. d'iode pour 100 grammes de liquide) est donc due à l'action de l'iode hydrosoluble en présence de KI; le titre de la dilution est calculé en solution d'iode sans tenir compte de l'iodure de potassium ajouté qui n'agit ici que comme modificateur de l'état physique de l'iode. Il convient d'utiliser le liquide de Lugol fraîchement dilué. D'autre part le mélange de solutions d'iode et d'iodure de potassium après dilution n'agit pas comme une dilution de liquide de Lugol. Quelque curieuse que soit cette spécificité de l'iode hydrosoluble pour la larve d'ankylostome, il est clair, que des taux semblables de poison ne permettent guère d'envisager une prophylaxie par la destruction des larves dans la nature. Ni l'iode ni la nicotine au 1/10.000 n'empêchent l'éclosion des oeufs.

Dans des capsules où sont éclos des oeufs, notamment à la glacière, j'ai observé à maintes reprises des larves mobiles attachées par la queue, par rosaces comptant jusqu'à 7 individus. Le noeud semble être entortillé par torsion des extrémités. Pour essayer de comprendre le phénomène, j'ai isolé des systèmes de 2 larves. On s'aperçoit alors que dans ces systèmes simples, les larves se touchent simplement bout à bout par une extremité effilée. Maintenues en observation sous le microscope, elles n'arrivent pas à se détacher malgré les efforts qu'elles semblent faire pour se séparer, même si l'observation

est prolongée pendant 24 heures. Quand l'une avance dans une direction déterminée, l'autre est obligée de suivre.

Dans les systèmes à trois larves, on peut également observer la continuité que rien ne semble conditionner. Il n'y a pas de torsion de la queue ni du noeud.

RESUME

1. — En Belgique, les chiens de rue sont infestés d'*Uncinaria stenocephala*, à raison de 23 %.

2. — Cette infestation parait peu pathogène, même quand elle est massive.

3. — Un chien maintenu 4 mois en captivité s'est débarrassé de la plupart de ses parasites sans traitement. Il est habituel de voir une réduction importante mais incomplète des oeufs dans les déjections.

4. — Description des techniques employées pour la lévigation et la culture des matières fécales infectées.

5. — Les oeufs d'*Uncinaria* résistent longtemps à la température de la glacière (+3 et —3°) et éclosent même tardivement et partiellement à —3°.

6. — Action de divers réactifs (NaCl, peptone, urine, lait, sérum) sur l'éclosion des oeufs.

7. — Action des divers réactifs sur les larves. La solution de Lugol à 1/10.000 d'iode et la nicotine au même taux, tuent les larves en moins de 24 heures.

8. — On observe dans les collections artificielles de larves des agglutinats de 2 à 7 larves qui sont accrochées par leur extrémité postérieure, elles peuvent survivre longtemps sans parvenir à se détacher.

RIASSUNTO

1 — Nel Belgio i cani randagi sono infestati da *Uncinaria stenocephala* nella misura del 23 %.

2 — L'infestazione sembra scarsamente patogena, anche quando è massiva.

3 — Un cane tenuto in cattività per 4 mesi si è liberato della maggior parte dei parassiti pur senza aver subito alcun trattamento. E' abituale osservare una riduzione notevole ma incompleta delle uova nelle feci.

4 — Descrizione delle tecniche impiegate per la concentrazione delle larve nella cultura di materie fecali infette.

5 — Le uova di *Uncinaria* resistono a lungo alla temperatura della ghiacciaia (+3° e —3°) e schiudono, sia pure tardivamente e solo in parte, a —3°.

6 — Azione di diverse sostanze (NaCl, peptone, urina, latte, siero) sulla schiusura delle uova.

7 — Azione di diverse sostanze sulle larve. La soluzione di Lugol a 1/10.000 di iodio e la nicotina alla stessa concentrazione uccidono le larve in meno di 24 ore.

8 — Nelle raccolte di larve sviluppatesi in cultura si osservano spesso gruppi di 2-7 larve attaccate per l'estremità posteriore; esse possono sopravvivere a lungo senza giungere a distaccarsi.

SUMMARY

1 — In Belgium, straying dogs are infested by *U. stenocephala* at the rate of 23 %.

2 — Such an infestation seems to be scarcely pathogenic, even when it is a massive one.

3 — A dog, kept in captivity for four months, eliminated the greatest part of the parasites without any treatment. It is common to observe a noticeable, but incomplete, reduction of eggs in the feces.

4 — Description of the technique employed for the concentration of larvae in cultures of infected stools.

5 — The eggs of *Uncinaria* resist for a long time at a temperature of +3° to —3°C and hatch, eventhough with delay and only a part of them, at —3°C.

6 — Action of various substances NaCl, peptone, urine, milk, serum) on the hatching of eggs.

7 — Action of various substances on larvae. Lugol's solution at a concentration of 1/10.000 of iodine and a nicotine solution at the same concentration kill the larvae in less than 24 hours.

8 — Groups of 2-7 larvae which are tangled by their posterior end may be observed in cultured larvae; they can survive for a long time without becoming free.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fülleborn, F. (1927) *Festschrift f. B. Nocht.*
2. Astrup, A. (1945) *Ugeskrift for Laeger.* 107.
3. Clayton Lane (1932) *Hookworm infection.*
4. Baermann, G. (1917) *Geneeskundig Tijdsch. v. Ned. Indie.* LVII. La description de son appareil est reprise par
5. Cort, W. W., J. E. Ackert, D. L. Augustine, F. K. Payne (1922) *Am. Jl Hyg. 2*, 1-16.
6. Brumpt, E. cité par Langeron, Précis de Microscopie.
7. Brumpt, E. Communication de L. Brumpt and Dr. Wanson.
8. Oliver, Sir T. (1910) *Lancet*, I, 356-359.
9. Bruns, H. (1904) *Klin. Jahrbuch.*
10. Manouvriez A. (1905) *Bull Ac. Méd. Paris, 3*, 514-531.
11. Boycott, A. E. & J. S. Haldane (1903), III, 95 (1904), IV, 73.
12. Lambinet, J. (1901-1902). *Bull. Ac. Méd. Belgique.*
13. Nicoll, W. (1917) *Parasitology*, IX, 155-189.
14. Parnell, I. W. (1938-1939) *Can. Jl of Research, Sect D.*
15. Penso, G. (1933) *Ann. d'Igiene, 43*, 332.
16. Ackert, J. E. & F. L. Ligenzowski (1951) *Am. Jl Trop. Méd.*

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

AN INFRARED SPECTROMETRIC STUDY OF THE *CULEX PIPIENS* COMPLEX

DON W. MICKS (*) and FRANCO SCROLLINI (**)

Despite the progress which has been made in the taxonomic classification of mosquitoes, certain problems have arisen with regard to the exact relationship between certain species, particularly those belonging to groups or complexes. The *Culex pipiens* and *Anopheles maculipennis* complexes in particular have been the object of considerable investigation in an effort to provide a consistently good method for accurately distinguishing between species comprising these groups. Almost without exception the problem has been approached from the biological point of view. However, several years ago it seemed to us that it might be possible to differentiate between closely related mosquitoes on the basis of qualitative or quantitative differences in their biochemical constitution. Infrared spectrophotometry was one method chosen for this purpose. Accordingly, a preliminary investigation was made to determine the applicability of this particular tool. Using mosquito extracts (aqueous), it was possible to obtain reproducible absorption spectra for *Culex molestus*, *C. fatigans* and *Aedes aegypti* by which identification of these species was possible (MICKS and BENEDICT, 1953).

On the basis of these findings it was subsequently decided to utilize infrared spectrometry in a study of the *Culex pipiens* and *Anopheles maculipennis* complexes. The present report therefore, represents an extension of this method to the study of carbon disulfide extracts of mosquitoes belonging to the *Culex pipiens* complex.

(*) *Laboratory of Medical Entomology, Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Texas Medical Branch.*

(**) *Istituto di Zoologia, Università di Pavia.*

Materials and Methods

The mosquitoes used in this study were American *Culex pipiens* (Illinois), European *C. pipiens* (Italy), *C. fatigans* (California) and *C. molestus* (Germany). All strains were maintained in the laboratory with the exception of the European *pipiens* which were collected as hibernating adults. Unfed adult female mosquitoes were allowed to emerge in one-foot square cages and were approximately the same age when used (24 to 48 hours). They were anesthetized with ether and immediately weighed, after which they were transferred to a tissue grinder and homogenized in carbon disulfide (1.5 ml. per 80 mg. of specimens). The homogenate was centrifuged at 6000 RPM for 15 minutes and the clear, colorless supernate retained. The latter was then concentrated to about one-half of its volume and slowly added dropwise to a round sodium chloride disc (25 mm. in diameter and 5 mm. thick) with a 0.02 ml. pipette. This procedure was performed under an infrared lamp in order to keep the material confined to a small area (about 5 mm. in diameter) and to speed evaporation. All preparations were analyzed immediately after preparation. At least five extracts of different generations of each species were studied except for European *pipiens* where there were three. Initially, the entire spectrum from 5.2 to 18.5 microns was analyzed. Subsequent observations, however, were confined to the 13 to 17 micron range since it was in this zone that differences between the species were most evident. A carbon disulfide control was run with each extract. The infrared absorption spectra were determined with a Perkin-Elmer Model 12C recording spectrometer equipped with a sodium chloride prism.

Results and Discussion

The spectra obtained were found to be reproducible with different extracts of the same species. Figure 1 for example, shows the marked similarity between four preparations of *C. molestus*. Equally consistent results were obtained with the other species used. Although the same major absorption bands were observed in all preparations, it was noted that in the relatively broad band between 13.8 and 14.5 microns there were quantitative differences between the species. As can be seen in Figure 2, extracts of C *pipiens* presented a rounded, comparatively shallow band, whereas those of *fatigans* exhibited a deeper band with a different slope and an indentation in the lower left part of the curve. *C. molestus* extracts demonstrated the most absorption in this range with a deeper curve than either of the other two species.

After obtaining absorption spectra for all the American species, a number of hibernating adult female mosquitoes were collected in Pavia. They were all identified as *C. pipiens* and extracts of these were also analyzed

with the infrared spectrometer. The resulting spectra were found to be practically identical to those obtained from extracts of American *pipiens*,

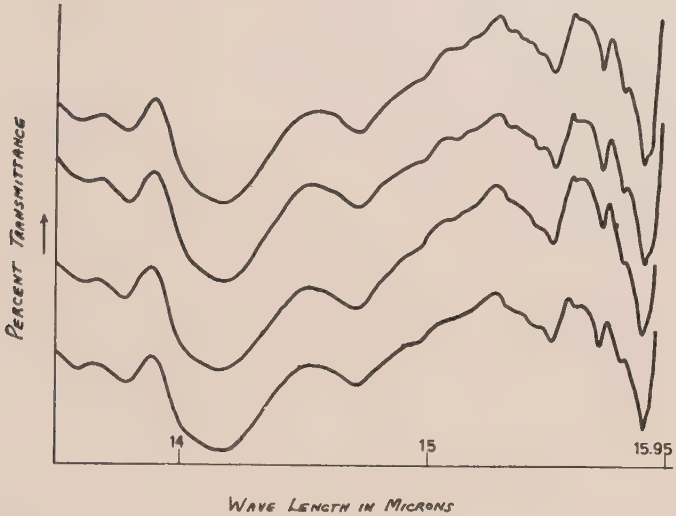


Figure 1. Spectra of four different carbon disulfide extracts of *Culex molestus* mosquitoes.

as can be seen by comparing A and B of Figure 2. In order to facilitate a direct comparison of the quantitative differences between strains, the curves from four extracts each af *pipiens*, *fatigans* and *molestus* were mat-

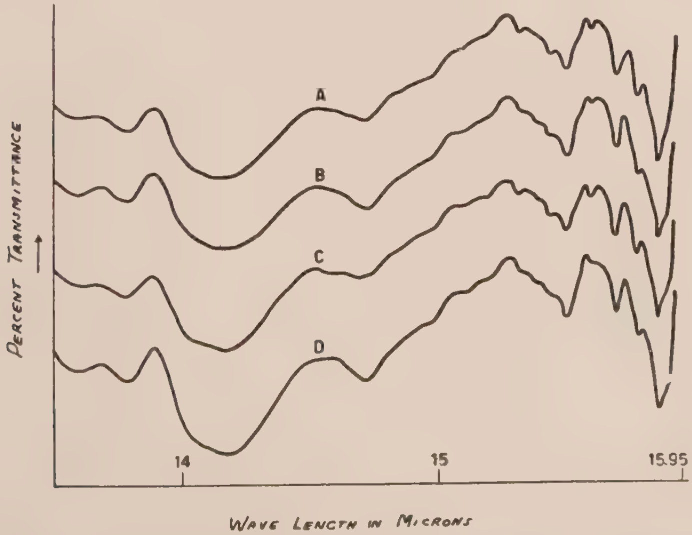


Figure 2. Spectra of carbon disulfide extracts of four mosquito strains: A, C. *pipiens* (European); B, C. *pipiens* (American); C, C. *fatigans* and D, C. *molestus*.

ched at random (Figure 3). European *pipiens* was not included inasmuch as the absorption curve for this species coincided almost exactly with that of the American strain.

It appears from the present results that the infrared spectrometric examination of carbon disulfide extracts of mosquitoes may provide a very useful tool for distinguishing between members of a complex. It is interesting that the absorption spectra of the two strains of *pipiens* were essentially the same in spite of the fact that the European specimens had undoubtedly been in hibernation for a considerable period of time. This agreement between the taxonomic identity and the infrared spectra of these tho strains suggests that this spectrometric method may be an exacting one. The extent of its usefulness in distinguishing between strains of the same species remains to be seen.

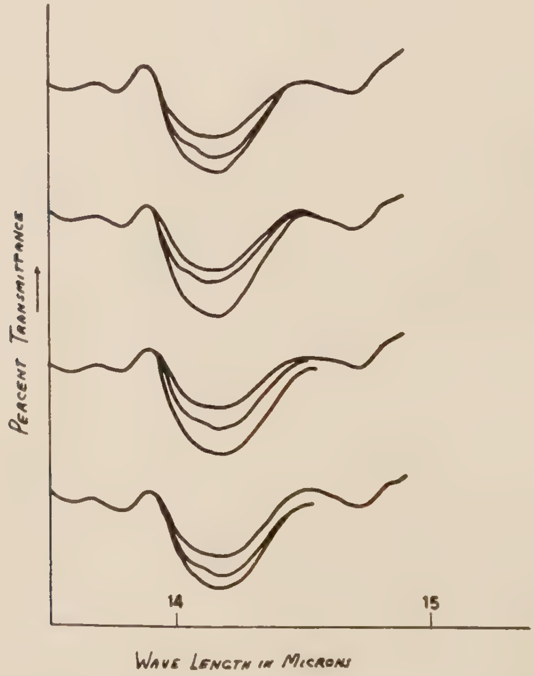


Figure 3. Comparison of absorption bands of four carbon disulfide extracts each of *C. pipiens*, *C. fatigans*, and *C. molestus*, the upper, middle and lower curves respectively of each group.

As noted in our previous work with aqueous extracts (MICKS and BENEDICT, 1953), the spectra obtained with carbon disulfide extracts remained qualitatively the same with dilution although the intensities of the bands decreased proportionately. It may be therefore, that by increasing the speed of centrifugation, the concentration or both, the infrared method would have

even greater value as an analytical tool. A similar investigation of the *Anopheles maculipennis* complex is now underway and will be the subject of another report.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their sincere thanks to Professor REGGIANI MARIO and his associates at the Istituto Ranzoni, Milano for their kind assistance and use of their spectrometer.

SUMMARY

Carbon disulfide extracts of American and European *Culex pipiens, C. fatigans* and *C. molestus* were studied with the infrared spectrometer. The adult females of these species could be identified by differences in the shape and depth of the band from about 13.8 to 14.5 microns.

SOMMARIO

Estratti in solfuro di carbonio di *Culex fatigans, C. molestus* e di *C. pipiens* americane ed europee sono stati studiati con lo spettrofotometro a raggi infrarossi. Le femmine adulte di queste specie potrebbero essere identificate per le differenze che prsentano nella forma e nella profondità delle bande comprese fra 13.8 a 14.5 micron.

BIBLIOGRAPHY

MICKS, D. W. and BENEDICT, A. (1953). Infrared spectrophotometry as a means for identification of mosquitoes. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, *84*, 12-14.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

NOTE E OSSERVAZIONI

NOTE SULL'*AEDES MARIAE*, SERG. 1903 NELLE SALINE DEL LIBANO

La costa settentrionale del Libano, tra Batroun e Tripoli è cosparsa di piccole saline rifornite di acqua di mare per mezzo di pompe a vento. La zona è infestata da nugoli di voracissimi *Aëdes mariae* e la popolazione costiera, esasperata dalle punture e cosciente dello sviluppo di queste zanzare nelle saline, ha minacciato di denunciare i proprietari delle saline — tutte illegali in regime di monopolio! — e obbligarli a distruggere le istallazioni se non venivano prese delle misure adeguate contro le zanzare. La distruzione delle saline avrebbe aumentato la disoccupazione già considerevole, e allora il buon senso prevalendo sulla legge — fatto frequente nel bacino del Mediterraneo — una inchiesta ufficiale è stata compiuta per vedere se era possibile mantenere i molti lavoratori impiegati nel loro utile e illegale lavoro, dando tuttavia qualche soddisfazione alla popolazione ferocemente punta.

E' noto che *Aë. mariae* si sviluppa nell'acqua salata, l'adulto è exofilo e attacca l'uomo di notte e di giorno, pungendo perfino i bagnanti che nuotano a qualche diecina di metri dalla costa, quando essi tengono la testa fuori dell'acqua (1); esso ha anche una discreta dispersione di volo (2). Si è voluto portare attenzione ai seguenti fattori, in condizioni naturali:

1) *Modo di operare le saline fino alla produzione del sale.* Le saline, situate sulla costa rocciosa, formano come tante piccole terrazze adattate con fondo e bordi di cemento sul declivio delle roccie; misurano m. 1-2 × 2-3 con profondità di 20-25 cm. Per ciascun gruppo di 6-10 bacini di essiccamento esiste un bacino di riserva — sia naturale a fondo irregolare in un cavo di roccia più o meno completato con cemento, sia artificiale a fondo piatto — profondo 100-150 cm. e situato a un livello un po' più alto. In ciascun bacino di riserva giunge il tubo che versa a volontà quando necessario l'acqua di mare sollevata da una pompa a vento. Per gravità l'acqua di mare, dopo un soggiorno più o meno lungo nei bacini di riserva, ove si è più o meno concentrata, viene distribuita nei bacini di essiccamento. La produzione del sale si fa durante la stagione calda e senza mai pioggie che va da maggio alla fine di ottobre.

2) *Concentrazione massima di sale che permette la vita larvale.* Nel mese di luglio 1952 sono state compiute le seguenti osservazioni:

Osservazione in:	T. C. dell'acqua al sole	Stadi e frequenza di *Aëdes mariae*						NaCl °/₀₀ nell'acqua gr.	Cl °/₀₀ nell'acqua gr.	N° della osservazione
		Uova	Larve				Ninfe			
			I	II	III	IV				
Acqua di mare presso la riva	28.8	—	—	—	—	—	—	35.4	21.5	1
» » »	28.8	—	—	—	—	—	—	35.9	21.8	2
Bacino di riserva . . .	30 5	—	—	++	++	++	++	37.7	22.9	3
» » . . .	31.1	++	+++	+++	+++	+++	+++	42.4	25.7	4
» » . . .	31.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	46.6	28.3	5
» » . . .	30.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	47.7	28.9	6
» » » . .	—	+	—	++	++	++	+	55.6	33.7	7
Bacino di essiccamento .	33.8	+	+	+	+	+	+	59.4	36.0	8
Raccolta naturale sugli scogli	30.0	+	—	—	—	—	—	59.4	36.0	9
» » .	30.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	60.5	38.7	10
Bacino di essiccamento .	33.6	++	—	++	++	++	++	78.1	47.3	11
» »	—	—	—	—	+	+	—	97.7	59.3	12
Bacino di riserva . . .	31.6	++	++	++	++	++	++**	108.4	65.7	13
Bacino di essiccamento .	33.8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	109.4	66.3	14
» »	34.4	—	++	++	++	++	++*	146 8	89.0	15
» »	—	—	—	—	+	—	—*	148.6	90.1	16
» »	35.5	++	++	++	++	++	++**	188.0	113.8	17
» »		—	—	—	—	—	—	188.9	114.6	18
» »	36.6	+	+	+	+	+	+***	211.2	128.0	19
» »	34.4	—	—	—	—	—	—	300.7	182.3	20
» »	35.8	—	—	—	—	—	—	303.5	183.6	21
» »	37.7	—	—	—	—	+	—***	304 8	184.7	22
» »	40.0	—	—	—	—	—	—	313.3	189.9	23
» »	—	—	—	—	—		—	368.6	223.4	24

— = assenti
\+ = meno di 5 per m² di superficie di acqua
++ = tra 6 e 20 » » »
+++ = più di 20 » » »

* = alcune morte
** = la maggior parte morte
*** = tutte morte
riferito all'insieme di tutti gli stadi di sviluppo presenti

3) *Tempo di concentrazione dell'acqua di mare in rapporto con il tempo di sviluppo larvale di Aë. mariae.* Nel mese di luglio (T. C. media mensile dell'aria 26, umidità relativa media mensile 75 %) occorrono in media 15 giorni perchè l'acqua contenuta nei bacini di riserva, distribuita nei bacini di essiccamento, diventi sale. La concentrazione salina media dei bacini di riserva, al momento della distribuzione dell'acqua nei bacini di essiccamento, è risultata di 55.6 gr. NaCl °/₀₀ (=33.7 gr. Cl °/₀₀) e non è mai risultata inferiore a 48.0 gr. NaCl °/₀₀ durante le presenti osservazioni. Il tempo necessario (in luglio) a che il contenuto salino dell'acqua si concentri da 55.6 gr. a 188 gr. NaCl °/₀₀ — concentrazione alla quale la vita larvale di *Aë. mariae* appare interrotta — è di 7 giorni. Lo sviluppo larvale di *Aë. mariae*, stimolato da salinità dell'acqua (3), da alta temperatura e da esposizione al sole (4) è assai rapido, ma sperimentando nelle condizioni più naturali possibili in luglio, non si è riusciti ad avere il completamento del ciclo da uovo ad alata in meno di 8 giorni. Sembra dunque che almeno nel mese di luglio — uno dei periodi di maggiore infestazione — *Aë. mariae* non abbia modo di completare lo sviluppo nei bacini di essiccamento perchè il sale raggiunge una concentrazione letale per le forme acquatiche della zanzara prima che questa abbia avuto tempo di completare il suo ciclo di sviluppo. Resta da spiegare la presenza di ninfe nei bacini di essiccamento (osservazioni N. 8 e 11) a concentrazione salina ancora bassa; è probabile che si tratti di casi di trasferimento passivo di larve dai bacini di riserva ai bacini di essiccamento al momento del riempimento di questi ultimi. Si noti incidentalmente che, con-

trariamente ai risultati di Pantazis (3) e concordemente a quelli di di Trensz (5) e di Mathis (6), si è ottenuto nel Libano sviluppo completo di *Aë. mariae* in acqua distillata in laboratorio.

4) *Eventuali misure di controllo.* Il controllo dovrebbe quindi essere esercitato sui bacini di riserva e sulle numerose raccolte naturali di acqua marina sulle roccie, che appaiono come i principali responsabili dello sviluppo di *Aë. mariae.* La lotta anti-larvale sembra il sistema ovvio. Comunque, dal 1952 ad oggi, essa non è stata ancora impiegata. E' risultato comunque di una certa importanza sociale il fatto di aver potuto diffondere la notizia che i bacini di essiccamento del sale non sono colpevoli, e che le raccolte naturali di acqua di mare sugli scogli — assai numerose — sono più importanti, a causa del numero, per la produzione di *Aë. mariae* degli stessi bacini di riserva.

LETTERATURA

(1) Barraud, P. (1921): *Bull. Ent. Res., 11*, 387-395.
(2) Senevet, G. (1919): *Bull. Soc. Hist. Nat. de l'Afr. du Nord, Algiers, 10* (8), 185-186.
(3) Pantazis, G. (1935): *Prakt. Acad. Athen., 10* (7), 348-356.
(4) Trensz, F. (1934): *C. R. Soc. Biol., 116* (10), 1108-1110.
(5) Trensz, F. (1933): *Arch. Inst. Pasteur Algérie, 11* (1), 15-18.
(6) Mathis, M. (1934): *Bull. Soc. Path Exot., 27* (8), 757-759.

GABRIELE GRAMICCIA

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

RECENSIONI

ADAMS A. R. D. e MAEGRAITH B. G. Clinical Tropical Diseases. Blackwell, Oxford, 1953, X + 508 pp., 65 figg., 1 tav. a colori f.t., 40 sh.

Gli AA. hanno inteso colmare con questo libro una lacuna della letteratura medica pratica, quella cioè di « un manuale che desse le informazioni essenziali per la diagnosi clinica ed il trattamento di quelle malattie che si incontrano principalmente nei tropici », e si può davvero affermare che hanno pienamente raggiunto il loro scopo. Il loro libro contiene veramente le « informazioni essenziali »: abolita ogni notizia di carattere storico, ogni discussione su fatti controversi e esposizione, ove non indispensabile, di teorie, ridotta a brevissimi cenni l'illustrazione degli agenti patogeni, la trattazione di ciascuna malattia riporta quasi solo quelle notizie che possono essere di utilità pratica, decorrendo secondo lo schema seguente: definizione, distribuzione geografica, etiologia, patologia, quadro clinico, diagnosi, trattamento; il tutto in modo assai sintetico, ma estremamente chiaro nella sua schematicità; ciò che fa facilmente pronosticare per questo libro un larghissimo favore sia da parte dei medici che svolgono la loro opera nelle regioni tropicali, che degli studenti di clinica delle malattie tropicali.

Il libro comprende XLVII capitoli, la maggior parte dei quali è dedicata alla trattazione di una singola forma morbosa, mentre solo pochi riuniscono, ma pur sempre in paragrafi separati, la trattazione di più malattie (diremo in proposito che non è facile da capire in più di un caso il criterio che ha indotto gli AA. a raggruppare certe forme morbose ed a tenerne invece separate altre). Quanto all'ordine dato alla materia, esso è piuttosto inconsueto essendo stata preferita, a quello sistematico abituale, la disposizione in ordine alfabetico delle varie malattie.

Belle e dimostrative sono in genere le figure; ottima, come di consueto, l'edizione.

M. RICCI

BROWN V. E.: Synopsis of Medical Entomology, Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Michigan, 1953, pp. 219, fig. 136.

Il BROWN, dopo 10 anni di insegnamento e 5 di ricerca nel campo dell'entomologia medica, ha compreso la necessità di un suo manuale riguardante questa materia, manuale che fosse « utile non solo come testo fondamentale ma anche come strumento nel campo pratico », una opera insomma per mezzo della quale, sia il medico che il parassitologo e l'entomologo fossero in grado di « classificare qualche insetto sospetto che potesse essere di importanza medica ».

Il manuale consiste di una rassegna di tutti i gruppi di artropodi di importanza medica ed è corredato da numerose tavole con chiari disegni schematici. Tuttavia, mentre per alcuni gruppi (acari, zecche, emitteri, culicini, ecc.) l'A. ha descritto singolarmente le varie specie accompagnandole con disegni dell'artropodo in toto o dei suoi dettagli, per quanto riguarda gli anofeli invece il BROWN ha preferito trattare le specie suddividendole in tanti gruppi a seconda dei caratteri morfologici. Non riusciamo a comprendere le ragioni che hanno indotto l'A. a trattare la materia secondo questo criterio, ma possiamo asserire che non ci sembra assolutamente il migliore per l'identificazione delle specie. Fatto questo che in aggiunta

alla mancanza di *chiavi* limitate a zone geografiche e comprendenti anche le specie non di importanza medica, ci lascia un poco perplessi circa le possibilità di « classificare un insetto sospetto », scopo questo prefissosi dall'A. nella prefazione, per mezzo del presente manuale.

Abbiamo avuto l'impressione, leggendo quest'opera, che essa non sia stata compilata con cura sufficiente, per cui ne sono derivate molte imperfezioni: troppi errori di stampa, specie nei nomi scientifici, inesattezze nel campo della sistematica, omissioni ed errori di lingua.

S. BETTINI

EICHLER W.: Behandlungstechnik parasitärer Insekten. Akademische Verlagsgesellscheft Geest & Portig K.-G., Leipzig, 1952. pp. 286, fig. 74. Prezzo: DM 19,60.

Una lunga serie di ricerche compiute nel campo degli insetti parassiti ha permesso all'A. di compilare con profonda conoscenza della materia un'opera di tecnica di considerevole valore pratico. Il volume raccoglie sia i frutti dell'esperienza personale dello EICHLER, sia numerose notizie di tecnica sparse nella letteratura e sapientemente raccolte dall'A. L'opera si divide in 10 parti che trattano i seguenti argomenti: ricerca dei parassiti, allevamenti, prove di tossicità, infezioni sperimentali, conservazione del materiale, preparazone di materiale secco, istologia, messa in archivio del materiale biologico, sviluppo degli insetti in rapporto alla temperatura, ecc. Molti chiari disegni ed alcune fotografie illustrano i vari argomenti. Riteniamo il presente volume di grande utilità per il lavoro di laboratorio e lo segnaliamo all'attenzione non solo dei parassitologi ed entomologi medici, ma anche di coloro che si occupano di problemi pratici di lotta e che potranno trovare nell'opera dello EICHLER una sicura guida per la raccolta, esame, allevamenti e *tests* del materiale biologico sotto studio.

S. BETTINI

Direttore responsabile: Dott. E. MOSNA

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma. Via della Guardiola, 22

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

IN ONORE DI

BATTISTA GRASSI

NEL CENTENARIO DELLA NASCITA

La Direzione e la Redazione desiderano esprimere il loro ringraziamento:

— a tutti gli Autori che hanno collaborato al presente fascicolo;

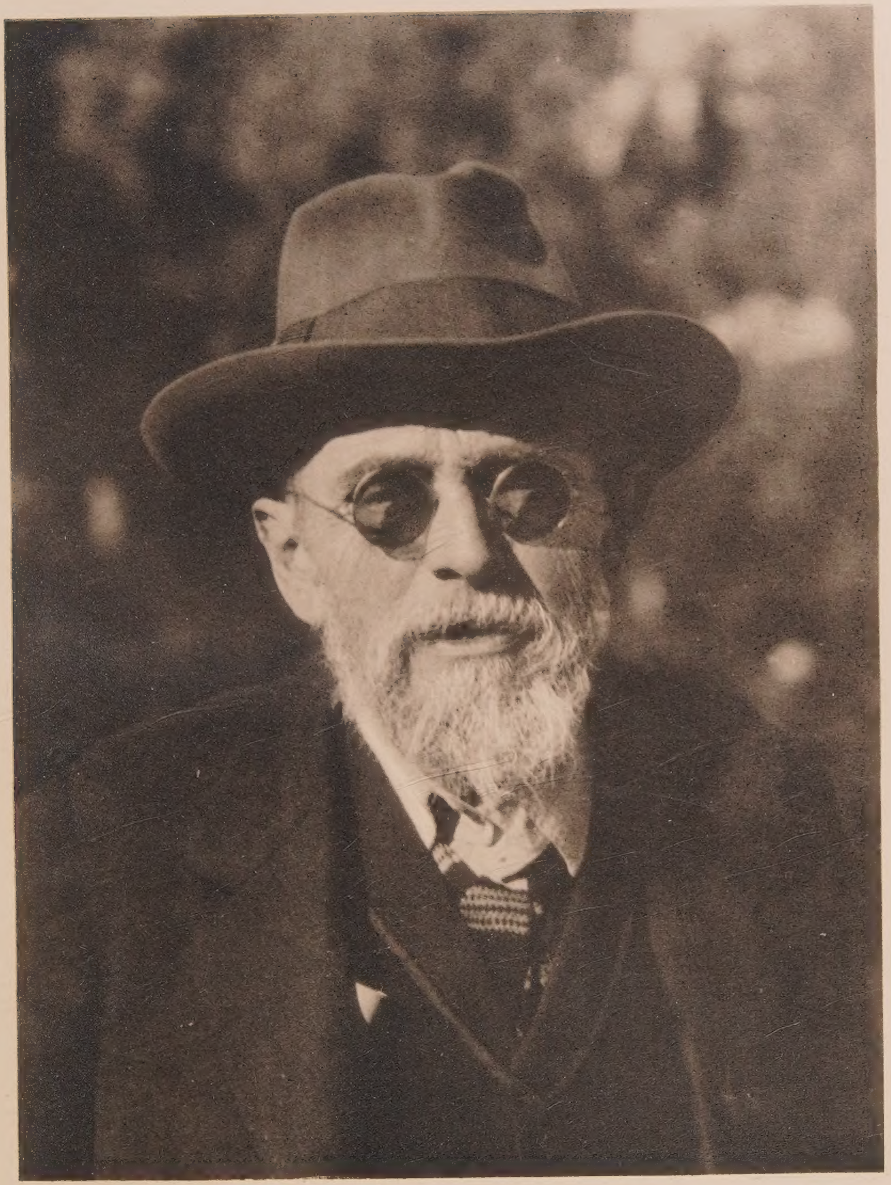
— all'Istituto Superiore di Sanità
all'Università di Roma
al Consiglio Nazionale delle Ricerche
all'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità
all'Università di Pavia
al Comune di Roma
al Comune di Pavia

che con i loro generosi contributi hanno reso possibile la pubblicazione del fascicolo stesso, e, con essi, al

Prof. Vittorio Tonolli, Direttore dell'Istituto Italiano di Idrobiologia « Dott. Marco de Marchi »

il quale ha spontaneamente voluto inviare un contributo a titolo personale;

— a quanti hanno sostenuto la loro fatica con l'appoggio morale, tra cui principalmente all'Accademia Nazionale dei Lincei.



BATTISTA GRASSI